

明細書

Nox1 ポリペプチドに対する抗体、Nox1 遺伝子を利用したガン診断方法、及びガン増殖抑制物質のスクリーニング方法

5

技術分野

本発明は、ガン関連遺伝子、及び該遺伝子にコードされたポリペプチドに基づく、ガン診断方法、ガン増殖抑制物質のスクリーニング方法、及び医薬組成物に関するものである。さらに詳細に述べると、突然変異 Ras ガン遺伝子と関連する Nox1 遺伝子、該遺伝子にコードされたポリペプチド、及び該ポリペプチド特異的抗体を用いるガン診断方法、ガン増殖抑制物質のスクリーニング方法、及びガン治療に用いる医薬組成物に関するものである。

15 背景技術

従来から、突然変異 Ras ガン遺伝子は、哺乳動物細胞のガン化、及びその進行に大きな影響を与えることが知られている（非特許文献 1）。例えば、突然変異 Ras ガン遺伝子は、その主要な下流経路の 1 つである Raf-MAPKK-MAPK 経路を介して、動物細胞をガン化し、進行させると考えられている（非特許文献 2）。

そして、このような知見に基づき、N-ras 腫瘍サプレッサーが欠損しているガン細胞を対象として、p94RB をコードする遺伝子を含む発現ベクター遺伝子を投与する腫瘍抑制遺伝子治療法（特許文献 1）や、H-ras、K-ras 及び N-ras の発ガン遺伝子を利用して腫瘍抑制遺伝子を同定する方法（特許文献 2）などが開発されてきた。

近年の研究により、突然変異 Ras 遺伝子により形質転換された細胞で、スーパーオキシド、 H_2O_2 などの活性酸素種（ROS）が生成されることが報告された（非特許文献 3）。そして、細胞内の低レベル ROS は、増殖因子で誘導される細胞増殖において、シグナル分子としての役割を演じていることから（非特許文献 4 及び 5）、突然変異 Ras 遺伝子に関連した ROS 生成の上昇は、動物細胞

BEST AVAILABLE COPY

の異常増殖の原因になると考えられるようになった。

しかし、突然変異 Ras 遺伝子によるガン化、ガンの進行促進などに関与する、活性酸素産生酵素はこれまで知られていなかった。

(特許文献 1) 特表平 08-508166 号公報

5 (特許文献 2) 特表平 10-504448 号公報

(非特許文献 1) Lowy, D. R. Annu. Rev. Biochem. 62, 851-891 (1993)

(非特許文献 2) McCormick, F. TCB. 9, M53-M56 (1999)

(非特許文献 3) Irani, K. et al. Science 275, 1649-1652 (1997)

(非特許文献 4) Sundaresan, M. et al. Science. 270, 296-299 (1995)

10 (非特許文献 5) Bae, Y. S. et al. J. Biol. Chem. 272, 217-221 (1997)

発明の開示

本発明は、突然変異 Ras ガン遺伝子と関連する Nox1 遺伝子、該遺伝子にコードされたポリペプチド、及び該ポリペプチド特異的抗体を用いるガン診断方法、ガン増殖抑制物質のスクリーニング方法、及びガン治療に用いる医薬組成物を提供することを目的とする。

本発明者らは、研究の結果、突然変異 Ras ガン遺伝子が、MAPKK-MAPK 経路において、スーパーオキシドを生成する NADPH 酸化酵素の触媒サブユニットのホモログ Nox1 (1、2 及び 3) の発現を著しく上昇させ、かつ該 Nox1 遺伝子の siRNA が、細胞接着依存性の増殖、その形態変化、無胸腺マウスにおける腫瘍の形成など、突然変異 Ras 遺伝子の表現型を効果的に抑えるという知見を得た。本発明者らは、当該知見に基づき前記課題を解決し、本発明を達成した。

したがって、本発明は、(1) 配列番号 2 のアミノ酸配列を含むポリペプチド；
(2) 配列番号 2 のアミノ酸配列から、アミノ酸残基 1 以上の置換、欠失、付
25 加及び／又は挿入によって変異したアミノ酸配列を有し、前記配列番号 2 のアミノ酸配列を含むポリペプチドに特異的な抗体の産生を誘導する、ポリペプチド；又は (3) (1) 又は (2) のポリペプチドの部分配列を有し、前記配列番号 2 のアミノ酸配列を含むポリペプチドに特異的な抗体の産生を誘導する、ポリペプチド断片を含む、抗体製造用組成物を提供する。

30 また、本発明は、前記抗体製造用組成物を、哺乳類に投与することを含む、

配列番号 2 のアミノ酸配列を含むポリペプチドに特異的な抗体の製造方法を提供する。

さらに、本発明は、配列番号 2 のアミノ酸配列を含むポリペプチドに特異的な抗体を提供する。

- 5 さらに、本発明は、配列番号 2 のアミノ酸配列を含むポリペプチドに特異的な抗体を、生物試料と接触させることを含む、ガンの診断方法を提供する。

さらに、本発明は、前記抗体を含む、ガン診断用組成物、及びガン治療用医薬組成物を提供する。

- さらに、本発明は、配列番号 1 のヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、
10 又はその断片を検出することを特徴とする、ガン診断方法を提供する。該検出は、ポリメラーゼ連鎖反応、又はリアルタイム定量的ポリメラーゼ連鎖反応により該ポリヌクレオチド、又はその断片を検出することにより行うのが好ましい。

- さらに、本発明は、配列番号 1 のヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、
15 又はその断片に対応する、siRNA を提供する。

さらに、本発明は、配列番号 1 のヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、又はその断片に対応する、siRNA；又は配列番号 1 の 71 位～1615 位のヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、又はその断片に対応する、siRNA を含む、ガン治療用医薬組成物を提供する。

- 20 さらに、本発明は、配列番号 1 のヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、又はその断片に対応する、siRNA；又は配列番号 1 の 71 位～1615 位のヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、又はその断片に対応する、siRNA によって形質転換された細胞を含む、ガン治療用医薬組成物を提供する。

- さらに、本発明は、Nox1 遺伝子を標的とするガン細胞増殖抑制物質のスクリー
25 ニング方法であって、(1) Nox1 遺伝子でトランスフェクションし、該形質転換細胞をスクリーニング対象物質と接触させた後、Nox1 活性の不活化を検出(1 次スクリーニング)し、かつ(2) その Nox1 を不活化する物質が、がん細胞増殖を抑制するか否かを調べることにより(2 次スクリーニング)、Nox1 遺伝子の発現、及び Nox1 活性の不活化を検出することを含む、該スクリー
30 ニング方法を提供する。

(定義)

本明細書における「ポリペプチド」という用語は、アミノ酸配列の一次構造、該一次構造のポリペプチド断片、立体構造を伴う生物活性を有するポリペプチド、又はタンパク質を意味する。

- 5 本明細書における「Nox1 ポリペプチド」とは、Nox1 遺伝子にコードされているポリペプチドをいい、全長ポリペプチド、及びポリペプチド断片の双方を含む。

- 本明細書における「ホモログ」という用語は、特定のアミノ酸配列を有するポリペプチド、又はタンパク質と、アミノ酸配列が相同性を有し、かつ共通の生物活性又は抗原性を有するポリペプチドをいう。
- 10

本明細書における「siRNA」という用語は、特定の遺伝子の発現を抑制する短 RNA 断片、又は該 RNA 断片とその相補鎖からなる二本鎖 RNA 分子を意味する。

- 本明細書における「突然変異 Ras 遺伝子」とは、腫瘍の形成に関与する状態に突然変異したヒト Ras 遺伝子をいう。例えば、ヒト膵臓ガンで多い K-Ras の 12 番目のグリシンからアスパラギン酸への突然変異、又はバリンやアルギニンへの突然変異、さらに肺ガンで見られる 12 番目、その他 13 番目、61 番目に起きる変異を有するヒト Ras 遺伝子である。
- 15

- 本明細書における、ポリペプチドの「アミノ酸配列の部分配列」とは、該アミノ酸配列に含まれる、少なくとも 8 個以上の連続するアミノ酸残基を含む配列をいう。
- 20

本明細書における「オリゴヌクレオチド」とは、通常、塩基を 100 個未満、好ましくは 6~99 個を含むヌクレオチドをいう。

25 図面の簡単な説明

図 1(a)は、実施例 1 におけるリアルタイム定量的ポリメラーゼ連鎖反応により遺伝子発現の解析を行った結果を示すグラフである。

図 1(b)、(c)及び(d)は、実施例 2 において、実施例 1 と同じ方法でリアルタイム定量的ポリメラーゼ連鎖反応を行い、Nox1 の発現を検出した結果を示す。

- 30 図 2 は、実施例 4 において、RNAi(1)、RNAi(3)、RNAi(5)を持続的にトランス

フェクトされた細胞株における、形質転換の結果を、M13F 及び 3.0Rev をプライマーとして PCR で確認した電気泳動像である。

図 3 は、実施例 4 における、Nox1 遺伝子が関与する細胞の形態の変化を比較した写真を示す。

- 5 図 4 は、実施例 4 において、細胞の形質転換を、足場非依存性の増殖能により調べるため、ソフトアガー培養において示された細胞株の接着依存的細胞増殖を測定し、その結果を示したグラフである。

- 図 5 は、実施例 4 において、K-Ras-NRK/neg-1 (neg-1)、K-Ras-NRK/RNAi(1)-7 (i(1)-7)、K-Ras-NRK/RNAi(3)-19 (i(3)-19)、及び K-Ras-NRK/RNAi(5)-7 (i(5)-7)
10 の各細胞の数を液体培地中で計測した、その増殖曲線を示すグラフである。

図 6 は、実施例 5 において、処理された細胞を可溶化し、510nm における吸光度を測定して NBT の減少を定量した結果を示すグラフである。

- 図 7 は、実施例 6 において、GFP と ratNox1 の融合ポリペプチドが産生されたこと、そして RNAi(1)、RNAi(3)、RNAi(5)の共発現は、これらのベクターの
15 量依存的に GFP-ratNox1 融合蛋白質の生産を抑えること（左パネル）、また該 RNAi コンストラクトは、標的遺伝子に対する特異性が高いこと（右パネル）を示すグラフである。

- 図 8 は、実施例 6 において、内在性の Nox1 の mRNA 発現が、各細胞において、K-Ras-NRK、及び K-Ras-NRK/neg-1 に比べて抑制されていることを、RT-PCR
20 により確認した電気泳動像である。

図 9 は、実施例 7 において、使用した siRNA が GFP、または GFP - humanNox1 の発現を抑制しないことを、実施例 6 と同様の手法によりイムノブロッティングすることにより示した像である。

- 図 10 は、実施例 7 において、siRNA により一度抑制された Nox1 を回復することによる細胞への影響を K-Ras-NRK 細胞の形状変化により示す写真である。
25

図 11 は、siRNA により一度抑制された Nox1 を回復することによる細胞への影響を、細胞の増殖速度により示すグラフである。

- 図 12 は、siRNA により一度抑制された Nox1 を回復することによる細胞への影響を、足場非依存性増殖能により調べるため、ソフトアガー培養法を用い
30

て細胞の接着依存的増殖能を検討した結果を示すグラフである。

図 1 3 は、実施例 9 における、突然変異 Ras の形質転換に対する Nox1 遺伝子の発現の影響の検討で、細胞の形態変化を観察した結果を示すグラフである。

図 1 4 は、実施例 9 における、突然変異 Ras による腫瘍形成に対する siRNA の影響を、ヌードマウスの腫瘍形成を 1 ヶ月間に渡り観察し、かつ腫瘍の体積を測定することにより示したグラフである。

発明を実施するための最良の形態

本発明の抗体製造用組成物は、(1) 配列番号 2 のアミノ酸配列を含むポリペプチド；(2) 配列番号 2 のアミノ酸配列から、アミノ酸残基 1 以上の置換、欠失、付加及び／又は挿入によって変異したアミノ酸配列を有し、前記配列番号 2 のアミノ酸配列を含むポリペプチドに特異的な抗体の産生を誘導する、ポリペプチド；又は(3) (1) 又は(2) のポリペプチドの部分配列を有し、前記配列番号 2 のアミノ酸配列を含むポリペプチドに特異的な抗体の産生を誘導する、ポリペプチド断片を含むものである。

なお、本発明の抗体製造用組成物は、配列番号 2 のアミノ酸配列と少なくとも 80%、好ましくは 90%、特に好ましくは 95% の相同性を有するポリペプチドを含んでいてもよい。本明細書におけるアミノ酸配列の相同性とは、一線上に並べた場合における、基準となるアミノ酸配列と比較されるアミノ酸配列との同一性(%)をいう。該相同性は、塩基配列やアミノ酸配列の相同性検索を行うための標準のプログラムである、BLAST (J. Mol. Biol., 215, 403 (1990)) や FASTA (Methods in Enzymology, 183, 63-69) 等の解析ソフトで、デフォルト(初期設定)のパラメータを用いて計算することができる。

配列番号 2 のアミノ酸配列を含むポリペプチドは、Nox1 遺伝子にコードされたポリペプチドであり、該ポリペプチドの産生を検出することにより、検査対象の組織のガン化、及びガンの進行をスクリーニングできる。なお、該組成物で製造された抗体は、ヒト Nox1 ポリペプチドに特異的であるが、さらに非ヒト動物が産生する該ポリペプチドのホモログにも特異性を有する場合、非ヒト動物のガン化、及びガン進行のスクリーニングにも使用できる。したがって、該抗体製造用組成物は、ヒトガン細胞検出用抗体、及びヒト Nox1 ポリペプチ

ドのホモログを産生し得る哺乳類のガン化、及びガン進行のスクリーニング用抗体の製造にも使用することができる。

また、配列番号 2 のアミノ酸配列の部分配列とは、該アミノ酸配列に含まれる、少なくとも 8 個以上の連続するアミノ酸配列をであって、配列番号 2 のアミノ酸配列を含むポリペプチドに特異的な抗体の産生を誘導するエпитープとなるものをいう。なお、該部分配列をエпитープとして用いる場合、適当なキャリアータンパク質を組み合わせる用いることができる。

また、本発明のポリペプチド断片は、前記ポリペプチド (1) 及び (2) の断片であって、前記配列番号 2 のアミノ酸配列を含むポリペプチドに特異的な抗体の産生を誘導するものである。

また該ペプチド断片の長さは、特に限定されるものではないが、通常 20 個～200 個、好ましくは 20 個～100 個、さらに好ましくは 20～70 個のアミノ酸残基長である。

本明細書において、ポリペプチド、該ホモログ及び該ポリペプチドの断片 (以下、必要な場合はポリペプチドと略す。) は、標準的標記法に従い、左端が N 末端 (アミノ末端)、右端が C 末端 (カルボキシル末端) である。該ポリペプチド等は、C 末端がカルボキシル基 (-COOH)、カルボキシレート (-COO-)、アミド (-CONH₂) 又はエステル (-COOR) とすることもできる。このエステルの側鎖 R の例を挙げると、例えば、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチルなどの C1-6 アルキル基、シクロペンチル、シクロヘキシルなどの C3-8 シクロアルキル基、フェニル、 α -ナフチルなどの C6-12 アリール基、ベンジル、フェネチルなどのフェニル-C1-2 アルキル基、又は α -ナフチルメチルなどの α -ナフチル-C1-2 アルキル基などのアルキル基などがある。

また、本発明のポリペプチド等は、N 末端のアミノ酸残基のアミノ基が、ホルミル基、アセチル基などの保護基、生体内で切断されて生成する N 末端のグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基 (例えば -OH、-SH、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など) が適当な保護基で保護されたもの、又は糖鎖が結合したいわゆる糖タンパク質などの複合タンパク質なども含まれる。

また、本発明のポリペプチド等は、生理学的に許容し得る無機又は有機酸付

加塩として用いることができる。該無機酸付加塩の例を挙げると、塩酸、リン酸、臭化水素酸、及び硫酸の塩があり、また有機酸付加塩の例を挙げると、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、及びベンゼンスルホン酸などの塩がある。

すなわち、本発明の抗体製造用組成物は、前記ポリペプチド、そのホモログ、これらのペプチド断片、又はこれらの酸付加塩を含むものである。また、必要に応じて、該組成物はベヒクル、希釈剤、アジュバンドなどの成分を含んでもよい。

10 本発明では、前記抗体製造用組成物を用いて、配列番号2のアミノ酸配列を含むポリペプチド、そのホモログ、又は該ペプチド断片に特異的な抗体を製造する方法を提供する。

本発明の方法で製造する抗体は、本発明の目的に応じて使用できるものであれば特に制限されないが、例を挙げると、ヒト/マウスキメラ抗体、ヒト化抗体、又はヒト抗体などがある。ここで、ヒト化抗体 (Humanized Antibody) とは、
15 全抗体中に数%のマウス由来抗体を含むものをいい、ヒト抗体とは 100%ヒト由来の抗体からなるものをいい、キメラ・ヒト抗体とは、マウス由来抗体を 10~20%含むものをいう。また、該抗体は、ポリクローナル抗体、又はモノクローナル抗体のいずれであってもよい。

20 本発明のモノクローナル抗体は、次の方法で製造することができる。まず、前記抗体製造用組成物を非ヒト哺乳動物に投与する。抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常 2~6 週毎に 1 回ずつ、計 2~10 回程度行う。該非ヒト哺乳動物の例を挙げると、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、
25 ヤギ、及びニワトリがあり、一般に好ましいのはマウス、又はラットである。

前記組成物で免疫した非ヒト哺乳動物から抗体産生が認められた個体を選択し、最終免疫の 2~5 日後に脾臓、又はリンパ節に含まれる抗体産生細胞採取し、同種、又は異種動物の骨髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを作製する。抗血清中の抗体価の測定は、標識化タンパク質と抗血清とを反応させ、抗体に結合した標識剤の活性を測定することによ
30

り行う。また細胞融合は、ケーラーとミルスタインの方法 (Nature, 256, 495, 1975) などの常法で行うことができる。融合促進剤として、例えば、ポリエチレングリコール (PEG) やセンダイウィルスなどを用いることができる。

また、骨髓腫細胞の例を挙げると、NS-1、P3U1、SP2/O、及び AP-1 などの
5 非ヒト哺乳動物の骨髓腫細胞があり、特に P3U1 が好ましい。融合に用いる抗体産生細胞 (脾臓細胞) 数と骨髓腫細胞数との好ましい比率は 1:1~20 程度であり、PEG、好ましくは PEG1000~PEG6000 を 10~80% 度の濃度で添加し、20~40℃、好ましくは 30~37℃ で 1~10 分間インキュベートすることにより細胞融合を実施できる。

10 モノクローナル抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングは、種々の方法で行うことができる。例えば、抗原を直接、又は担体とともに吸着させた固相 (例えば、マイクロプレート) と、ハイブリドーマ培養上清を接触させ、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体を含む溶液を接触させ、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体など
15 を吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を接触させ、次いで放射性物質や酵素などで標識したタンパク質の溶液と接触させ、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法などがある。

モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの選別は常法で行うことができる。例えば、HAT (ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン) を添加した動物細胞用培地に、10~20% の牛胎児血清を含む RPMI 1640 培地、1~10% の牛胎児血清を含む GIT 培地 (和光純薬工業 (株))、又はハイブリドーマ培養用無血清培地 (SFM-101、日水製薬 (株)) などを用いることができる。培養温度は 20~40℃、培養時間は、通常 5 日~3 週間で、培養は、通常 5% 炭酸ガス存在下で行う。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗体価の
25 測定と同様にして測定できる。

また、得られたモノクローナル抗体の分離精製は、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、及び電気泳動法などの免疫グロブリンの分離精製法、イオン交換体 (DEAE) による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相、又はプロテイン A 活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法などの常法で行うことができる。
30

また、本発明のポリクローナル抗体は、免疫抗原である前記ポリペプチド等、又は該そのペプチド断片とキャリアタンパク質との複合体で、非ヒト哺乳動物を免疫し、その後、血清などの抗体含有成分を採取して、抗体の分離精製を行うことにより製造することができる。

- 5 該免疫抗原とキャリアタンパク質との混合比は、キャリアーに架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率よく産生されるように決定する。例えば、ウシ血清アルブミンやウシサイログロブリン、ヘモシアニン等を重量比でハプテン 1 に対し、約 0.1~20、好ましくは約 1~5 の割合で用いることができる。また、ハプテンとキャリアーのカップリングには、グルタルアルデヒドやカル
- 10 ボジイミド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオビリジル基を含有する活性エステル試薬等を用いることができる。

- 該複合体抗原は、単独で、又は担体、希釈剤、さらに抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントとともに投与してもよい。投与は、通常約 2~6 週毎に 1 回ずつ、計約 3~10 回行う。該
- 15 ポリクローナル抗体は、免疫された哺乳動物の血液、腹水、卵黄などから採取する。抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。また、ポリクローナル抗体の分離精製は、前記モノクローナル抗体の分離精製と同様に行うことができる。

- 本発明のガン診断用キットは、このようにして得られたポリクローナル、又は
- 20 モノクローナル抗体を含む。また、該診断用キットは、必要に応じて、免疫反応用ウェル、染色剤、検出用の酵素標識抗体、洗浄液、抗体希釈液、検体希釈液、酵素基質、酵素基質液希釈液、その他の試薬を含むものである。

- 本発明の抗体を含む医薬組成物は、Nox1 遺伝子にコードされている特異的タンパク質の発現を抑制するものであるから、ガン化の予防、進行遅延、及び治療に使用することができる。
- 25

該抗体は、経口的に、又は非経口的に投与することができ、さらに該非経口的投与は、組織への局所的な投与を含む。

- 本発明の医薬組成物を経口投与する場合、汎用されている担体などの製剤用成分、例えば、充填剤、増量剤、結合剤、崩壊剤、崩壊抑制剤、緩衝剤、等張
- 30 化剤、乳化剤、分散剤、安定化剤、コーティング剤、界面活性剤、吸収促進剤、

保湿剤、湿潤剤、吸着剤、滑沢剤及び賦形剤などを用いることができる。また、必要に応じて着色剤、保存剤、香料、風味剤、甘味剤などの添加剤を用いてもよい。

製薬用成分の具体的な例を挙げると、乳糖、白糖、塩化ナトリウム、ブドウ糖、尿素、デンプン、炭酸カルシウム、カオリン、結晶セルロース、ケイ酸などの賦形剤、水、エタノール、単シロップ、ブドウ糖液、デンプン液、ゼラチン溶液、カルボキシメチルセルロース、セラツク、メチルセルロース、リン酸カリウム、ポリビニルピロリドンなどの結合剤、乾燥デンプン、アルギン酸ナトリウム、カンテン末、ラミナラン末、炭酸水素ナトリウム、炭酸カルシウム、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、ラウリル硫酸ナトリウム、ステアリン酸モノグリセリド、デンプン、乳糖などの崩壊剤、白糖、ステアリン酸、カカオバター、水素添加油などの崩壊抑制剤、第4級アンモニウム塩、ラウリル硫酸ナトリウムなどの吸収促進剤、グリセリン、デンプンなどの保湿剤、デンプン、乳糖、カオリン、ベントナイト、コロイド状ケイ酸等の吸着剤、精製タルク、ステアリン酸塩等の滑沢剤などである。さらに必要に応じて、上記の各剤形について公知のドラッグデリバリーシステムの技術を採用し徐放化、局所適用化（トローチ、バッカル剤、舌下錠等）、薬物放出制御、腸溶性化、胃溶性化などを施すことができる。

また、非経口投与する場合、点滴、静脈注射、皮下注射、筋肉注射などの注射による投与、油脂製坐剤、水溶性坐剤、座剤による直腸投与などの形態とすることができる。該調剤は、製薬分野における通常の担体を用い、常法により容易に行うことができる。

本発明の抗体を含む医薬組成物は、例えば、ヒト、その他の哺乳動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。その投与量は、対象の状態、投与ルートなどにより適宜変わるが、例えば、経口投与する場合、一般的に、体重 60kg の成人患者においては、一日につき約 10～4000mg、好ましくは約 20～2000mg、より好ましくは約 50～500mg 投与する。非経口的に投与する場合は、該 siRNA の 1 回投与量は投与対象、肝臓ガンの状況などによっても異なるが、例えば、注射剤の形で体重 60kg の成人患者においては、一日につき約 10～

2000mg 程度、好ましくは約 20～1000mg 程度、より好ましくは約 50～500mg 程度を静脈から投与するのが好ましい。

また、本発明の抗体を、生物試料と接触させることを含む、免疫化学的測定法によって、生体組織や体液中の Nox1 遺伝子の検出・定量を行い、ガンを診断することができる。

この免疫化学的測定法を行う場合、本発明の抗体を担体に保持する。該測定方法で用いる担体の例を挙げると、アガロースゲル（セファロース 4B、及びセファロース 6B（ファルマシア・ファインケミカル社））、デキストランゲル（セファデックス G-75、セファデックス G-100、及びセファデックス G-200（ファルマシア・ファインケミカル社））、ポリアクリルアミドゲル（パイオゲル P-30、パイオゲル P-60、及びパイオゲル P-100（バイオラッド・ラボラトリーズ社））、セルロース粒子（アビセル（旭化成））などのゲル粒子、ジエチルアミノエチルセルロース、カルボキシメチルセルロースなどのイオン交換セルロース、ガラス、シリコン片、ステンレス系樹脂などの物質的吸着剤、イムノアッセイ用プレート（ヌンク社）、弱塩基性陰イオン交換樹脂（アンバーライト IR-4B、ダウエックス 3（ダウケミカル社））などがある。

担体に抗体を保持させるには、ブロムシアン法、及びグルタルアルデヒド法などの常法による行うことができる。また、より簡便な方法として物理的に抗体表面に吸着させてもよい。標識剤を結合させた抗体における標識剤としては、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが挙げられるが、酵素を用いるのが好ましい。

該酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 β -D-ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼを用いることができ、特にペルオキシダーゼが好ましい。

本発明の免疫化学的測定系における被検試料としては、尿、血清、血漿、髄液等の体液、又は、動物細胞やその培養上清がある。本発明の免疫化学的測定方法を行う場合、担体に保持された抗体に、測定すべき Nox1 ポリペプチドなど分析対象物を加えて抗原抗体反応を行った後、標識剤と抗 Nox1 抗体との結合物を加えて反応させる。得られた反応生成物に標識剤、例えば酵素の基質を加え、生じた物質の吸光度もしくは蛍光強度を測定することにより該反応生成

物の酵素活性を知ることができる。これを既知量の標識剤、例えば酵素の標準溶液に対してあらかじめ行い、Nox1 ポリペプチドなどとの吸光度、又は蛍光強度との関係を標準曲線として作成しておき、未知量の Nox1 ポリペプチドを含む分析対象物（被検試料）について得られた吸光度もしくは蛍光強度を標準曲線と比較し、分析対象物中の Nox1 ポリペプチド等の量を測定する。

また、本発明は、配列番号1のヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、又はその断片を検出することを特徴とする、ガン診断方法を提供する。該ポリヌクレオチド、又はその断片の検出は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、又はリアルタイム定量的ポリメラーゼ連鎖反応により常法で行うことができる。

10 該ポリメラーゼ連鎖反応、又はリアルタイム定量的ポリメラーゼ連鎖反応において、配列番号 1 のヌクレオチド配列に対するセンス鎖断片をフォワードプライマーとして、アンチセンス鎖断片をリバースプライマーとして用いる。該
15 フォワードプライマーの長さは、特に制限する必要はないが、通常 14~60 ベースであり、かつリバースプライマーの長さも特に制限する必要はないが、通常
20 14~60 ベースとするのが好ましい。また、本発明のガン診断方法で用いるフォワードプライマー、及びリバースプライマーの例を挙げると下記のものがある。

フォワードプライマー 5'- GGAGCAGGAATTGGGGTCAC -3' (配列番号：5)
リバープライマー 5'- TTGCTGTCCCATCCGGTGAG -3' (配列番号：6)

また、前記リアルタイム定量的ポリメラーゼ連鎖反応により検出を行う場合に用いる、フォワードプライマー、リバースプライマー、及び TaqMan プローブの例を挙げると下記のものがある。

25 フォワードプライマー
 5' - CCACTGTAGGCGCCCTAAGTT -3' (配列番号：7)

 リバースプライマー
 5' - AAGAATGACCGGTGCAAGGA -3' (配列番号：8)

 TaqMan プローブ
30 5' - AAGGGCATCCCCCTGAGTCTTGAA -3' (配列番号：9)

本発明における、配列番号 1 のヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、
又はその断片に対応する、siRNA、又は siRNA は、Nox1 遺伝子の発現を抑制し、
Nox1 ポリペプチドの産生を低下させる。したがって、該 siRNA 又はオリゴヌ
5 クレオチドを用いることにより、突然変異 Ras 遺伝子に誘導される細胞のガン
化、又はガンの進行を抑制することができるであろう。

なお、本発明の siRNA、又はオリゴヌクレオチドとは、配列番号 1 の連続す
るヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、又はその断片に相補的なヌクレ
オチド、又はオリゴヌクレオチドをいう。

10 本発明の siRNA は、また、配列番号 1 の 71 位～1615 位のヌクレオチド配列
を含むポリヌクレオチド、又はその断片に対応するものであってもよい。また、
該 siRNA の長さは、100bp 未満、好ましくは 8～99bp、特に好ましくは 10～30bp
である。また、好ましい ssi の例を挙げると下記のものがある。

15 ヒト Nox1 に対する siRNA

5'-GCGTGGCTTCAGCATGGAATTCAAGAGATTCCATGCTGAAGCCACGCTTTT
TTGGAAA-3'

(配列番号：10)

5'-GGGCTTTCGAACAACAATATTCAAGAGATATTGTTGTTTCGAAAGCCCTTTTT
20 TGGAAA-3'

(配列番号：11)

ラット Nox1 に対する siRNA

5'-GTTATGAGAAGTCTGACAAGTTCAAGAGACTTGTCTCAGACTTCTCATAATTT
25 TTTGGAAA-3'

(配列番号：12)

5'-GATTCTTGGCTAAATCCCATTTCAAGAGATGGGATTTAGCCAAGAATCTTTTT
TGGAAA-3'

(配列番号：13)

30 5'-GGACATTTGAACAACAGCATTCAAGAGATGCTGTTGTTCAAATGTCCTTTT

TTGGAAA-3'

(配列番号：14)

また、本発明の siRNA は、治療対象に直接投与するか、治療対象から細胞を取り出した後、インフェクションさせて該細胞を治療対象に戻すか、又は発現ベクターに組み込んだ後、該ベクターを治療対象に投与して発現させることにより使用することができる。

したがって、本発明では、配列番号1のヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、又はその断片に対応する、siRNA；又は配列番号1の71位～1615位のヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、又はその断片に対応する、siRNAを含む、ガン治療用医薬組成物を提供する。

該医薬組成物は、先に記載した抗体を含む医薬組成物と同じく、従来使用されている医薬用の材料を使用し、かつ常法で製剤することができる。また、本発明の siRNA を含む医薬組成物は、例えば、ヒト、その他の哺乳動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。その投与量は、対象の状態、投与ルートなどにより適宜変わるが、例えば、経口投与する場合、一般的に、体重 60kg の成人患者においては、一日につき約 10～4000mg、好ましくは約 20～2000mg、より好ましくは約 50～500mg 投与する。非経口的に投与する場合は、該 siRNA の1回投与量は投与対象、対象ガンの状況などによっても異なるが、例えば、注射剤の形で体重 60kg の成人患者においては、一日につき約 10～2000mg 程度、好ましくは約 20～1000mg 程度、より好ましくは約 50～500mg 程度を静脈から投与するのが好ましい。

また、本発明は、配列番号1のヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、又はその断片に対応する、siRNA；又は配列番号1の71位～1615位のヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、又はその断片に対応する、siRNA によって形質転換された細胞を含む、ガン治療用医薬組成物を提供する。

ここで該形質転換される細胞は、第三者から提供を受けた細胞であっても、治療対象の患者から取り出された細胞であってもよい。また、該形質転換した細胞をガン治療用細胞として使用することができる。

また、本発明は、配列番号1のヌクレオチド配列の部分配列、又は該部分配

列の少なくとも 1 塩基が付加、欠失、又は置換された変異ヌクレオチド配列からなり、かつ、ヒト細胞の Nox1 ポリペプチドの発現を抑制する RNA 分子を提供する。該 RNA 分子 (siRNA) は、公知の方法 (例、Nature、411 巻、494 頁、2001 年) に準じて、本発明のポリヌクレオチドの配列をもとに設計することができる。

5 なお、本発明の RNA 分子を In vivo 又は In vitro で使用する場合、該 RNA 分子とその相補的 RNA からなる 2 本鎖 RNA 分子とする。この場合、該二本鎖 RNA 分子が細胞内で分解しないよう、又は一本鎖に解離しないよう処理するのが好ましい。例えば、該 RNA 分子の 3'-末端に水酸基付加する、二本鎖の両末端を
10 チオホスホリル基によって化学結合させる、又各鎖の間に紫外線、ビス (2-クロロメチル) アミン、4-チオウラシル、ソラレンなどの二官能基により化学結合を誘導するなどの方法で処理することである。本発明の該 RNA 分子は、突然変異 Ras 遺伝子による形質転換に伴う Nox1 遺伝子の発現を抑制するものであるから、細胞のガン化防止、ガンの進行抑制、治療用の医薬組成物として使用
15 することができる。

また、本発明は、Nox1 遺伝子を標的とするガン細胞増殖抑制物質のスクリーニング方法を提供する。該スクリーニング方法において、突然変異 Ras 遺伝子を有する細胞や、Nox1 遺伝子でトランスフェクションした正常細胞を、スクリーニング対象物質と接触させた後、Nox1 遺伝子の発現とその酵素活性の不活化
20 を検出する。次に、該形質転換細胞を、スクリーニング対象物質とともに培養して増殖抑制能を調べる。

また、スクリーニング対象化合物による Nox1 遺伝子発現への影響は、リアルタイム定量的ポリメラーゼ連鎖反応による mRNA 発現増減の検出、抗体による Nox1 遺伝子にコードされたポリペプチド、又はそのペプチド断片の検出、
25 又はその形質転換細胞の形態変化を観察することで行うことができる。

該スクリーニング方法で使用する、突然変異 Ras 遺伝子を有する細胞は特に制限されないが、例えば、H-Ras-NIH3T3 細胞、K-Ras-NRK 細胞、又は膵臓癌細胞などを使用することができる。また、Nox1 遺伝子の導入に用いるベクターとして、例えば、pEGFP-C1 (コントロール)、pEGFP-C1-Nox1 などを用いること
30 ができ、さらに、siRNA を発現させるベクターとして、例えば pSilencer を用

いることができる。

なお、NIH3T3 細胞、又は NRK 細胞に pEGF-C1-Nox1 ベクターをリポフェク
タミン法を用いて持続的にトランスフェクトして、Nox1 を高発現する細胞株を
樹立することができる。あるいは、突然変異 Ras 遺伝子を有する膵臓癌細胞を
5 利用することもできる。該膵臓癌細胞は、ヒト膵臓癌患者より、分離・樹立し
たものを用いるのが好ましい。これらの細胞を、CO₂ 5 % の存在下、標準培養
液 (Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)、牛胎仔血清 (FBS) 10% 含有)
中で培養する。スクリーニングは、マルチプレート (96 穴、48 穴) に細胞を培
養して、スクリーニング対象物質を加え、大量、迅速に処理することができる。

10

(実施例 1)

突然変異 Ras 遺伝子による Nox1 遺伝子の発現上昇の確認

本発明者らは、NIH3T3 細胞における Nox1 遺伝子の過剰発現が、スーパーオ
キシドの生成と細胞増殖を上昇させることから (1 及び 2)、Nox1 が特定のがん
15 遺伝子の形質発現と関連すると考えた。そこで、K-Ras Val12 ガン遺伝子で形質
転換した細胞を用いて、Ras ガン遺伝子による Nox1 遺伝子発現の上昇を確認し
た。

まず、ラット腎臓細胞 (NRK) 及び K-Ras-NRK 細胞 (Kirstein murine sarcoma
virus transformed NRK cells) を準備した。なお、K-Ras-NRK は、ATCC から購入
20 した。

まず、ラット腎臓細胞 (NRK) 及び K-Ras-NRK 細胞における Nox1 の発現の
有無を、リアルタイム定量的ポリメラーゼ連鎖反応により検出した。該リアル
タイム定量的ポリメラーゼ連鎖反応では、配列番号 15 のフォワードプライマ
ー、及び配列番号 16 のリバースプライマー、及び配列番号 17 の TaqManMGB
25 プローブを使用した。

フォワードプライマー：

5'- GGTCACCTCCCTTTGCTTCCA -3' (配列番号：15)

リバースプライマー：

30 5'- GGCAAAGGCACCTGTCTCTCT -3' (配列番号：16)

TaqManMGB プローブ :

5'- TCCAGTAGAAATAGATCTTT -3' (配列番号 : 17)

なお、該リアルタイム定量的ポリメラーゼ連鎖反応は、ABI Prism 7700 (アプライド・バイオシステムズ) を用い、反応条件はデフォルト設定で行った。

5 解析値の標準化には rRNA 18S を用いた。

該リアルタイム定量的ポリメラーゼ連鎖反応により遺伝子発現の解析を行った結果、図 1 (a) のグラフに示されているように、K-Ras ガン遺伝子で形質転換した K-Ras-NRK 細胞において、Nox1 遺伝子の発現は上昇していた。

10 (実施例 2)

突然変異 Ras 遺伝子による一過的トランスフェクションによる Nox1 遺伝子の発現上昇の確認

突然変異 Ras 遺伝子の一過性のトランスフェクションによる影響を解析するため、pcDNA3.1 ベクター (空ベクター)、及び pcDNA3.1 担持 Ras Val12 ベクター (pcDNA3.1 carrying Ras Val12 vectors) を使用して、NRK 細胞に一過的にトランスフェクションし、48 時間後、Nox1 の発現を検出するため、実施例 1 と同じ方法でリアルタイム定量的ポリメラーゼ連鎖反応を行った。その結果、図 1 (b) に示すように、コントロールベクターを用いた場合の発現と比較して、H-Ras Val12 を一過的にトランスフェクションした NRK 細胞においても、Nox1 遺伝子の発現は、増加していた。なお、トランスフェクションした Ras V12 の発現は、ウサギ抗 Ras 抗体を用いるイムノブロッティング (IB) で確認した。

20 なお、該イムノブロッティングは、試料細胞 1×10^5 個を、 $2 \times$ サンプルバッファー (0.1M トリス Cl、pH 6.8、グリセロール 20%、SDS4%、DTT3.1%、BPP0.001%) で可溶化し、該ポリペプチドを SDS ゲル電気泳動により分離し、
25 続いてイムノブロッティングにより解析した。

タンパク質をトランスファーバッファー (25mM トリス Cl pH8.3、92mM グリシン、メタノール 20%) 中で電氣的にニトロセルロース膜に移し、抗-Ras 抗体 (1 次抗体) と、HRP-結合抗ウサギ-IgG 抗体に反応させ、化学発行 (ECL) 法で検出した。

30 このように実施例 1 及び 2 の結果から、Nox1 遺伝子発現の上昇は突然変異

Ras ガン遺伝子の働きによることが示された。

なお、無血清状態で一晚培養した NIH3T3 細胞を、血清（30%）又は上皮増殖因子（epidermal growth factor: EGF）50 ng/ml で促進処理を行ったのち、リアルタイム定量的ポリメラーゼ連鎖反応により解析した。その結果、図 1(c)、及び(d)に示すように培養開始から 12 時間以内に Nox1 遺伝子の発現が 6~20 倍に上昇した。つまり、Nox1 遺伝子の発現は、細胞増殖を促進する因子と関連しており、これは、血小板由来増殖因子（platelet-derived growth factor: PDGF）とアンジオテンシン II の両方がスーパーオキシド形成、及び血管平滑筋細胞の Nox1 遺伝子の発現を誘導するという報告と一致している（1、4）。

10

（実施例 3）

突然変異 Ras 遺伝子による Nox1 遺伝子発現を起こすシグナル経路の解析

突然変異 Ras 遺伝子による Nox1 遺伝子の発現上昇を起こす、Ras シグナル経路の下流を解析するため、一連の実験を行った。実施例 1 および 2 において、細胞に MAPKK の阻害剤である PD98059（PD : 20 μ M、100 μ M）を 12 時間処理し、K-Ras-NRK 細胞における Nox-1 の発現、血清、EGF による Nox1 の発現誘導をリアルタイム定量的ポリメラーゼ連鎖反応により解析した。

その結果、K-Ras-NRK 細胞における Nox-1 の発現は PD98059 により濃度依存性に抑制された（図 1(a)）。また、血清、EGF による Nox1 の発現誘導もそれぞれ PD98059 20 μ M で抑制された（図 1 (c)及び(d)）。

一方、コントロールの実験において、PI3 キナーゼの阻害剤であるウォルトマニン(wortmanin: 100nM)は、H-Ras-NIH3T3 細胞における Nox1 の発現上昇を阻害しなかった（データ示さず）。これらの結果から、突然変異 Ras 遺伝子とその増殖因子のシグナルが、PI3K を介する経路ではなく、Ras-MAPKK-MAPK を介して Nox1 の発現を誘導していることが示された。

25

（実施例 4）

突然変異 Ras 遺伝子による形質転換に対する、Nox1 遺伝子の関与

オリゴヌクレオチド 1-S、1-AS をアニーリングさせ、pSilencer hygro, H1-promoter（Ambion 社）にサブクローニングし、RNAi(1)とした。同様にオリ

30

ゴヌクレオチド 3-S、3-AS をアニーリングさせ、pSilencer hygro, H1-promoter (Ambion 社) にサブクローニングし、RNAi(3)とした。さらにオリゴヌクレオチド 5-S、5-AS をアニーリングさせ、pSilencer hygro, H1-promoter (Ambion 社) にサブクローニングし、RNAi(5)とした。また、コントロールベクターとして、

5 pSilencer hygro Negative Control plasmid (Ambion 社) を使用した。

RNAi(1)は、配列番号 3 の 223 位から 241 位を標的とする siRNA コンストラクションである。RNAi(3)は、配列番号 3 の 578 位から 596 位を標的とする siRNA コンストラクションである。RNAi(5)は、配列番号 3 の 1224 位から 1242 位を標的とする siRNA コンストラクションである。

10 なお、各オリゴヌクレオチドの配列は以下のとおりである。

1-S :

5'-GATCCCGTTATGAGAAGTCTGACAAGTTCAAGAGACTTGTCAGACTTCTCA
TAATTTTTTGGAAA-3'

15 (配列番号 : 1 8)

1-AS :

5'-AGCTTTTCCAAAAAATTATGAGAAGTCTGACAAGTCTCTTGAAGTTGTCAG
ACTTCTCATAACGG-3'

(配列番号 : 1 9)

20 3-S :

5'-GATCCCGATTCTTGGCTAAATCCCATTCAGAGATGGGATTTAGCCAAGAAT
CTTTTTTGGAAA-3'

(配列番号 : 2 0)

3-AS :

25 5'-AGCTTTTCCAAAAAAGATTCTTGGCTAAATCCCATCTCTTGAATGGGATTTA
GCCAAGAATCGG-3'

(配列番号 : 2 1)

5-S :

5'-GATCCCGGACATTTGAACAACAGCATTCAAGAGATGCTGTTGTTCAAATGT
30 CCTTTTTTGGAAA-3'

(配列番号：22)

5-AS :

5'-AGCTTTTCCAAAAAAGGACATTTGAACAACAGCATCTCTTGAATGCTGTTG
 5 TTCAAATGTCCGG-3'

(配列番号：23)

該 RNAi(1)、RNAi(3)、RNAi(5)、および pSilencer hygro Negative Control plasmid
 各 4 μ g を、リポフェクタミン(Lipofectamine: Gibco-BRL 社)を用いて、K-Ras-NRK
 10 細胞 1×10^6 個にそれぞれトランスフェクションした。トランスフェクションし
 た細胞は、選択を行うため、ウシ胎児血清 (FBS) 10%と HygromycinB を 400
 μ g/ml となるように加えた DMEM 培地を用い、CO₂ 5%の湿潤環境下におい
 て 37°C で 2~3 週間培養した。培養後、生き残ったコロニーを単離した。

RNAi(1)、RNAi(3)、RNAi(5)を持続的にトランスフェクトされた細胞株それぞ
 15 れ 3 クローンずつ (K-Ras-NRK/RNAi(1)-7, K-Ras-NRK/RNAi(1)-12, K-Ras-
 NRK/RNAi(1)-15 ; K-Ras-NRK/RNAi(3)-17, K-Ras-NRK/RNAi(3)-19, K-Ras-NRK
 /RNAi(3)-96 ; K-Ras-NRK/RNAi(5)-2, K-Ras-NRK/RNAi(5)-3, K-Ras-NRK
 /RNAi(5)-7)、pSilencer hygro Negative Control plasmid を持続的にトランスフェク
 トされた細胞を 2 クローン (K-Ras-NRK/neg-1、K-Ras-NRK/neg-2) 選択した。
 20 これらのコンストラクションのトランスフェクションは、M13F 及び 3.0Rev を
 プライマーとして PCR で確認した (図 2)。PCR の温度条件は、94°C 2 分、(94°C
 1 分、60°C 1 分、72°C 1 分) を 30 サイクル、72°C 10 分、とし、サーマルサイク
 ラー装置は Takara Thermal Cycler SP (宝酒造株式会社) を用いた。

25 (プライマー配列)

M13F : 5'- GTTTTCCCAGTCACGAC-3' (配列番号：24)

3.0Rev : 5'-GAGTTAGCTCACTCATTAGGC-3' (配列番号：25)

次に、Nox1 遺伝子が関与する細胞の形態の変化を比較した。その結果、図 3
 30 に示すように、RNAi(1)-(3)をトランスフェクトされた K-Ras-NRK 細胞が伸張し

たのに対し、pSilencer hygro Negative コントロールプラスミドをトランスフェクトされた K-Ras-NRK 細胞は、導入前の細胞で観察されたように、形態は丸いままだった。

次に、細胞の形質転換を、足場非依存性の増殖能を見ることにより調べるため、軟寒天培地アッセイを行った。細胞増殖に必要な栄養素を含んだ寒天 0.53% を含むアガーロースレイヤーを直径 6cm の培養皿に入れて固め、その上に寒天 0.3% と FBS10% を含んだ DMEM 培地に懸濁した細胞を、培養皿一枚当たりの細胞最終濃度が 1.5×10^4 個になるように重層した。次いで、CO₂ 5% の湿潤環境下、37°C で培養し、細胞コロニーの出現を 3 週間にわたり観察した。ソフトアガー培養において示された細胞株の接着依存的細胞増殖を測定し、その 3 回の +/- 平均の標準誤差 (s.e.m.) を図 4 に示した。その結果、K-Ras-NRK 細胞および pSilencer hygro Negative コントロールプラスミド (neg-1 と neg-2) のトランスフェクションでは、多くのコロニー形成が見られたが、RNAi(1)-(5) のトランスフェクションではコロニー形成が著明に抑制された。

さらに、K-Ras-NRK/neg-1 (neg-1)、K-Ras-NRK/RNAi(1)-7 (i(1)-7)、K-Ras-NRK/RNAi(3)-19 (i(3)-19)、及び K-Ras-NRK/i(5)-7 (i(5)-7) の各細胞を、培養皿から 10^4 個ずつ、培養液に移し、CO₂ 5% 存在下、標準培養液 (DMEM、FBS(10%)) 中で 6 日間、液体培養した。次いで、液体培地中の細胞数を計測して、その増殖曲線を図 5 に示した。その結果、K-Ras-NRK/RNAi(1)-7、K-Ras-NRK/RNAi(3)-19、及び K-Ras-NRK/RNAi(5)-7 の各細胞は、液体培養でも増殖率が減少したが、対照的に、K-Ras-NRK/neg-1 では増殖阻害効果は確認できなかった。

(実施例 5)

Nox1 遺伝子がコードする NADPH 酸化酵素によるスーパーオキシド産生の確認

本発明者らは、突然変異 Ras が誘導するスーパーオキシド産生における Nox1 の役割を評価するため、実施例 4 の形質転換細胞を用いて、スーパーオキシドの産生を NBT 還元解析で測定した。本実施例では、NBT (Nitroblue Tetrazolium) 解析に Suh らの方法を用いた (1)。すなわち、NBT 0.25% を含むハンクス (Hanks)

溶液 0.2ml に、活性酸素を消化する酵素、スーパーオキシドディスムターゼ (SOD) を 40 単位加えた溶液と加えない溶液を用意し、 2×10^5 個の細胞を懸濁し 37℃ で 8 分間処理した。処理された細胞を低速度遠心で分離し、ピリジン 0.5ml を加えて可溶化し、510nm における吸光度を測定して NBT の減少を定量した
5 (extinction coefficient of 11,000/M/cm)。得られたデータは、図 6 に 3 回の +/-s.e.m. で示した。

該解析の結果、K-Ras-NRK および K-Ras-NRK/neg-1 は、NBT の還元を増加させ、これはスーパーオキシドジスムターゼ処理により、NRK と比較し阻害された。対照的に、K-Ras-NRK/RNAi(1)-7、K-Ras-NRK/RNAi(3)-19、K-Ras-NRK
10 /RNAi(5)-7 は、K-Ras がん遺伝子の ROS 生産刺激効果を NRK 細胞レベルまで低下させ (図 6)、Nox1 が、突然変異 Ras 形質転換細胞における、スーパーオキシド生産の上昇に関与することが示された。

(実施例 6)

15 RNAi(1)、RNAi(3)、RNAi(5)による、Nox1 発現の減少の確認

本発明者らは、RNAi(1)、RNAi(3)、RNAi(5)により Nox1 発現が減少することを確認するため、次の手順で解析を行った。すなわち、GFP-ratNox1 の発現における RNAi(1)、RNAi(3)、RNAi(5)の阻害効果を評価するために、GFP-ratNox1 を、RNAi(1)-(5)それぞれとともに、共トランスフェクションし、実施例 2 と同様にイムノブロッティング解析を行った。図 7 左のパネルに示されるように、
20 予想される GFP と ratNox1 の融合ポリペプチドが産生されたこと、そして RNAi(1)、RNAi(3)、RNAi(5)の共発現は、これらのベクターの量依存的に GFP-ratNox1 融合蛋白質の生産を抑えることを明らかにした。なお、図 7 左のパネルにおける GFP-Nox1 の発現は、抗 GFP 抗体を用いたイムノブロッティングにより定量的に決定したものであり、図 7 左のパネルの数字はトランスフェクションした DNA の量 (μ g) を示している。また、RNAi(1)、RNAi(5)は、
25 どれもラットの Nox1 をターゲットとしている。図 7 左のパネルと同様の手法を用いて、RNAi(1)、RNAi(5)がヒトの Nox1 を抑制しない、すなわち、該 RNAi コンストラクションは、標的遺伝子に対する特異性が高いことを図 7 右のパネルに示す。
30

また、内在性の Nox1 の mRNA 発現が、K-Ras-NRK/RNAi(1)-7、K-Ras-NRK/RNAi(1)-12、K-Ras-NRK/RNAi(3)-19、K-Ras-NRK/RNAi(3)-96、K-Ras-NRK/RNAi(5)-2、K-Ras-NRK/RNAi(5)-7 の各細胞において、K-Ras-NRK、及び K-Ras-NRK/neg-1 に比べて確かに抑制されていることを、RT-PCR により示した。

5 その結果を図 8 に示す。

実施例 6 で用いた PCR 用プライマーの配列

フォワードプライマー： 5'-ATGGGAACTGGCTGGTTA-3'

(配列番号：26)

10 リバースプライマー： 5'-TCAGAACGTTTCTTTGTTGAA-3'

(配列番号：27)

本実施例における結果は、細胞骨格と接着蛋白質の構成変化による形態変化と同様に、Nox1 遺伝子の発現率の上昇と突然変異 Ras による形質転換が関連していることを示している。

15

(実施例 7)

siRNA により一度抑制された Nox1 を回復することによる細胞への影響

K-Ras-NRK/RNAi(1)-7、K-Ras-NRK/RNAi(5)-7 に、実施例 4 と同一手法によって pEGFP-C1 (GFP)、pEGFP-humanNox1 (GFP-Nox1) をそれぞれトランスフェクトし、実施例 6 と同様の手法により免疫プロットングした (図 9)。実施例 6、図 7 右のパネルで示したように、RNAi(1)および RNAi(5)はどちらもヒト Nox1 の発現を抑制しない。そのため、K-Ras-NRK/RNAi(1)-7、K-Ras-NRK/RNAi(5)-7 細胞に pEGFP-humanNox1 をトランスフェクトしても、これが siRNA によって抑制されることはない。

20

25

図 10 に示したように、K-Ras-NRK/RNAi(1)-7 にコントロールベクターを入れただけ (i(1)-7 + GFP) では siRNA を解除できず細胞は扁平だが、pEGFP-humanNox1 をトランスフェクトすることにより (i(1)-7 + GFP-Nox1-3)、形態は、以前の K-Ras-NRK 細胞に近い竊状の形態に戻った (図 10)。

30 実施例 4 と同手法による増殖曲線でも、K-Ras-NRK/RNAi(1)-7 にコントロー

ルベクターを入れたもの (GFP-59) や K-Ras-NRK/RNAi(5)-7 にコントロールベクターを入れたもの (GFP-78) に比べ、K-Ras-NRK/RNAi(1)-7 に pEGFP-humanNox1 を入れたもの (GFP-Nox1-3) や K-Ras-NRK/RNAi(5)-7 に pEGFP-humanNox1 を入れたもの (GFP-Nox1-11) では、増殖が早くなった (図 1 1)。また、実施例 4 と同様の軟寒天培地アッセイでも、K-Ras-NRK/RNAi(1)-7 にコントロールベクターを入れたもの (i(1)-7+GFP-59、i(1)-7+GFP-60) にくらべ、K-Ras-NRK/RNAi(1)-7 に pEGFP-humanNox1 を入れたもの (GFP-Nox1-2、GFP-Nox1-3) では、もとの K-Ras-NRK 細胞と同程度までコロニー形成が回復した (図 1 2)。

10

(実施例 8)

突然変異 Ras の形質転換に対する Nox1 遺伝子の発現の影響

Nox1 の阻害剤であるジフェニレンヨードニウム (Diphenylene iodonium: DPI) を用いて、Nox1 遺伝子の発現による、突然変異 Ras による形質転換細胞の形態に及ぼす影響を調べた。すなわち、K-Ras-NRK 細胞、及び NRK 細胞を、DPI20 μ M 又は PD98059 30 μ M を含む培地中で、CO₂ 5%を含む湿潤環境下において 37°Cで一晩培養し、形態変化を観察した。図 1 3 に細胞形態を記録した写真を示す。

図 1 3 に示すように、K-Ras-NRK 細胞を、フラボタンパク質阻害剤である DPI、又は抗酸化剤 n-アセチルシステイン (n-acetyl cysteine) 10mM (データ示さず) で、一晩処理した場合、該細胞が一過的に平たい形態を帯び、NRK 細胞に近い形態になった。さらに、図 1 3 に示すように、PD98059 で処理された K-Ras-NRK 細胞においても、このような形態の変化が観察された。したがって、Nox1 遺伝子発現の上昇が、Ras-MAPKK-MAPK 経路による突然変異 Ras の形質転換促進に必須であることが示された。

25

(実施例 9)

突然変異 Ras による腫瘍形成に対する、siRNA の影響

K-Ras-NRK/neg-1、K-Ras-NRK/RNAi(1)-7、K-Ras-NRK/RNAi(1)-12、K-Ras-NRK/RNAi(3)-19、K-Ras-NRK/RNAi(3)-96 および K-Ras-NRK/RNAi(5)-2 を無胸

30

腺マウスに移植し、腫瘍形成を観察した。すなわち該細胞 10^6 個を PBS 0.2ml に懸濁した後、ヌードマウス（無胸腺: Nu/Nu）の皮下に移植した。その後、該全ヌードマウスの腫瘍形成を 1 ヶ月間に渡り観察し、かつ腫瘍の体積を測定した。その結果を図 1 4 に示した。図 1 4 において、黒塗りのバーは腫瘍の体積
5 であり、誤差のバーは、s.e.m.を示し、また分数は使用した全マウスに対する、腫瘍を許容したマウスの割合（腫瘍／合計）を示している。

図 1 4 に示すように、K-Ras-NRK/neg-1 は、2 週間以内に活発な腫瘍を形成した。対照的に、K-Ras-NRK/RNAi(1)-7、K-Ras-NRK/RNAi(1)-12、K-Ras-NRK/RNAi(3)-19、K-Ras-NRK/RNAi(3)-96 は、腫瘍の増殖が著しく抑えられていた。
10 解剖により組織学的観察すると、K-Ras-NRK/neg-1 で形成された腫瘍は、血管が増加していた。これは、Nox1 遺伝子が、血管内皮増殖因子の産生増加による血管新生を誘導する可能性と一致している(1)。また、K-Ras-NRK/RNAi(1)-7、K-Ras-NRK/RNAi(1)-12、K-Ras-NRK/RNAi(3)-19、K-Ras-NRK/RNAi(3)-96 で形成された、小さな腫瘍では、大部分の細胞でネクロシスの兆候が示されていた
15 （データ示さず）。

これまでの実験結果から、突然変異 Ras（ガン遺伝子）は、分裂促進性酸化酵素 Nox1 を MAPKK-MAPK 経路を介して上昇させ、一方、Nox1 遺伝子の発現は、該 Ras による細胞の形質転換、ガン形成、及びその進行に必須である。すなわち、本発明者らの研究により、突然変異 Ras による形質転換において、Nox1
20 ポリペプチドがレドックスシグナル分子として必須の役割を果たしているという分子機構が明らかになった。

Gp91phox のホモログである Nox ファミリータンパク質 Nox1~5 は、非食細胞から同定され、それぞれ様々な細胞プロセスにおいて特異的な機能を果たしていると報告されている（1 及び 5-9）。それらの中で、Nox1 遺伝子は増殖因子
25 （1 及び 4）やガン遺伝子による、分裂促進性シグナルを仲介する、膜貫通型酸化酵素をコードしている点で特異である。

ROS が腫瘍の増殖促進に関係すること、及び悪性ガン細胞において ROS 産生が ROS 生産酵素を誘導する可能性を考慮すると(7)、Nox1 遺伝子及びそのポリペプチドは、ガン進行を抑制し、その治療を可能にする標的分子にできると考
30 えられる。

本明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

(配列番号：1) ヒト Nox1 遺伝子から転写された mRNA 又は cDNA のヌクレオチド配列を示す。

(配列番号：2) ヒト Nox1 遺伝子にコードされたポリペプチドのアミノ酸
5 配列を示す。

(配列番号：3) ラット Nox1 遺伝子から転写された mRNA 又は cDNA のヌクレオチド配列を示す。

(配列番号：4) ラット Nox1 遺伝子にコードされたポリペプチドのアミノ酸配列を示す。

10 (配列番号：5) ヒトガン診断方法で用いる Nox1 遺伝子に対するフォワードプライマーの塩基配列を示す。

(配列番号：6) ヒトガン診断方法で用いる Nox1 遺伝子に対するリバープライマーの塩基配列を示す。

(配列番号：7) ヒトの Nox1 遺伝子をリアルタイム定量的ポリメラーゼ連鎖反応により検出を行う場合に用いるフォワードプライマーの配列を示す。
15

(配列番号：8) ヒトの Nox1 遺伝子をリアルタイム定量的ポリメラーゼ連鎖反応により検出を行う場合に用いるリバープライマーの配列を示す。

(配列番号：9) ヒトの Nox1 遺伝子をリアルタイム定量的ポリメラーゼ連鎖反応により検出を行う場合に用いる TaqMan プローブの配列を示す。

20 (配列番号：10) 本発明のヒト Nox1 遺伝子に対する siRNA の塩基配列を示す。

(配列番号：11) 本発明のヒト Nox1 遺伝子に対する siRNA の塩基配列を示す。

(配列番号：12) 本発明のラット Nox1 遺伝子に対する siRNA の塩基配列
25 を示す。

(配列番号：13) 本発明のラット Nox1 遺伝子に対する siRNA の塩基配列を示す。

(配列番号：14) 本発明のラット Nox1 遺伝子に対する siRNA の塩基配列を示す。

30 (配列番号：15) 実施例1において、Nox1 の発現の有無を、リアルタイム

定量的ポリメラーゼ連鎖反応により検出するために用いたフォワードプライマーのヌクレオチド配列である。

- (配列番号：16) 実施例1において、Nox1の発現の有無を、リアルタイム定量的ポリメラーゼ連鎖反応により検出するために用いたリバースプライマーのヌクレオチド配列である。

(配列番号：17) 実施例1において、Nox1の発現の有無を、リアルタイム定量的ポリメラーゼ連鎖反応により検出するために用いた TaqManMGB プローブのヌクレオチド配列である。

- 10 (配列番号：18) 実施例4において、突然変異 Ras 遺伝子による形質転換に対する、Nox1 遺伝子の関与を調べるために用いた siRNA コンストラクションを構成するオリゴヌクレオチドのヌクレオチド配列である。

- (配列番号：19) 実施例4において、突然変異 Ras 遺伝子による形質転換に対する、Nox1 遺伝子の関与を調べるために用いた siRNA コンストラクションを構成するオリゴヌクレオチドのヌクレオチド配列である。

(配列番号：20) 実施例4において、突然変異 Ras 遺伝子による形質転換に対する、Nox1 遺伝子の関与を調べるために用いた siRNA コンストラクションを構成するオリゴヌクレオチドのヌクレオチド配列である。

- 20 (配列番号：21) 実施例4において、突然変異 Ras 遺伝子による形質転換に対する、Nox1 遺伝子の関与を調べるために用いた siRNA コンストラクションを構成するオリゴヌクレオチドのヌクレオチド配列である。

(配列番号：22) 実施例4において、突然変異 Ras 遺伝子による形質転換に対する、Nox1 遺伝子の関与を調べるために用いた siRNA コンストラクションを構成するオリゴヌクレオチドのヌクレオチド配列である。

- 25 (配列番号：23) 実施例4において、突然変異 Ras 遺伝子による形質転換に対する、Nox1 遺伝子の関与を調べるために用いた siRNA コンストラクションを構成するオリゴヌクレオチドのヌクレオチド配列である。

- (配列番号：24) 実施例4における、Nox1 遺伝子に対する siRNA のコンストラクションのトランスフェクションを確認するために用いた M13 プライマーのヌクレオチド配列である。

(配列番号：25) 実施例4における、Nox1 遺伝子に対する siRNA のコンストラクションのトランスフェクションを確認するために用いた3.0Revプライマーのヌクレオチド配列である。

(配列番号：26) 実施例6において、Nox1 発現の減少を確認するために用いたフォワードプライマーのヌクレオチド配列を示す。

(配列番号：27) 実施例6において、Nox1 発現の減少を確認するために用いたリバースプライマーのヌクレオチド配列を示す。

(参考文献)

- 10 1. Suh, Y-A, et al. Nature 401, 79-82 (1999)
2. Arnold, R. S. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 98, 5550-5555 (2001)
3. Arbiser, J. L. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 99, 715-720 (2001)
4. Lassegue B. et al. Circ. Res. 88, 888-894 (2001)
5. Lambeth, J. D., Dheng, G., Arnold, R. S. & Edens, W. A. TIBS. 25, 459-461
- 15 (2000)
6. Royer-Pokora, B. et al. Nature 322, 32-38 (1986)
7. Kikuchi, H., Hikage, M., Miyashita, H. & Fulumoto, M. Gene 269, 131-140 (2001)

請求の範囲

1. (1) 配列番号 2 のアミノ酸配列を含むポリペプチド; (2) 配列番号 2
のアミノ酸配列から、アミノ酸残基 1 以上の置換、欠失、付加及び/又は挿入
5 によって変異したアミノ酸配列を有し、前記配列番号 2 のアミノ酸配列を含む
ポリペプチドに特異的な抗体の産生を誘導する、ポリペプチド; 又は (3) (1)
又は (2) のポリペプチドの部分配列を有し、前記配列番号 2 のアミノ酸配列
を含むポリペプチドに特異的な抗体の産生を誘導する、ポリペプチド断片を含
む、抗体製造用組成物。
- 10 2. 該抗体が、ヒトガン細胞検出用抗体である請求項 1 記載の該組成物。
3. 配列番号 2 のアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む、請求項 1 記載の
該組成物。
4. 配列番号 2 のアミノ酸配列の部分配列を有し、前記配列番号 2 のアミノ
酸配列を含むポリペプチドに特異的な抗体の産生を誘導する、ポリペプチドを
15 含む、請求項 1 記載の該組成物。
5. 配列番号 2 のアミノ酸配列の部分配列を有し、前記配列番号 2 のアミノ
酸配列を含むポリペプチドに特異的な抗体の産生を誘導する、ポリペプチド断
片を含む、請求項 1 記載の該組成物。
6. 請求項 1 記載の組成物を、哺乳類に投与することを含む、配列番号 2 の
20 アミノ酸配列を含むポリペプチドに特異的な抗体の製造方法。
7. 配列番号 2 のアミノ酸配列を含むポリペプチドに特異的な抗体。
8. 該抗体が、ヒト/マウスキメラ抗体、ヒト型抗体、又はヒト抗体である、
請求項 7 記載の該抗体。
9. 該抗体が、ポリクローナル抗体、又はモノクローナル抗体である、請求
25 項 7 記載の該抗体。
10. 請求項 7 記載の抗体を、生物試料と接触させることを含む、ガンの診
断方法。
11. 請求項 7 記載の抗体を含む、ガン診断用キット。
12. 請求項 7 記載の抗体を含む、ガン治療用医薬組成物。
- 30 13. 該抗体が、ヒト/マウスキメラ抗体、ヒト型抗体、又はヒト抗体であ

る、請求項 1 2 記載の該ガン治療用医薬組成物。

1 4. 該抗体が、ポリクローナル抗体、又はモノクローナル抗体である、請求項 1 2 記載の該ガン治療用医薬組成物。

1 5. さらに適当なキャリアーを含む、請求項 1 2 記載の医薬組成物。

5 1 6. 配列番号 1 のヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、又はその断片を検出することを特徴とする、ガン診断方法。

1 7. ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)、又はリアルタイム定量的ポリメラーゼ連鎖反応により該ポリヌクレオチド、又はその断片を検出する、請求項 1 6 記載のガン診断方法。

10 1 8. 配列番号 1 のヌクレオチド配列に対するセンス鎖断片をフォワードプライマーとして、配列番号 1 のアンチセンス鎖断片をリバースプライマーとして用い PCR により検出を行う、請求項 1 7 記載のガン診断方法。

1 9. 前記フォワードプライマーの長さが 14~60 ベースであり、かつ前記リバースプライマーの長さが 14~60 ベースである、請求項 1 8 記載のガン診断方法。
15

2 0. 下記フォワードプライマー、及びリバースプライマーを用いる、請求項 1 8 記載のガン診断方法：

フォワードプライマー 5'-GGAGCAGGAATTGGGGTCAC-3' (配列番号：5)

リバースプライマー 5'-TTGCTGTCCCATCCGGTGAG-3' (配列番号：6)。

20 2 1. 配列番号 1 のヌクレオチド配列に対するセンス鎖断片をフォワードプライマーとして、配列番号 1 のアンチセンス鎖断片をリバースプライマーとして用いリアルタイム定量的ポリメラーゼ連鎖反応により検出を行う、請求項 1 7 記載のガン診断方法。

2 2. 下記フォワードプライマー、リバースプライマー、及び TaqMan プロ
25 ープを用いる、請求項 2 1 記載のガン診断方法：

フォワードプライマー 5' -CCACTGTAGGCGCCCTAAGTT-3'

(配列番号：7)

リバースプライマー 5' -AAGAATGACCGGTGCAAGGA-3'

(配列番号：8)

30 TaqMan プローブ 5' -AAGGGCATCCCCCTGAGTCTTGGA-3'

(配列番号：9)。

23. 配列番号1のヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、又はその断片に対応する、siRNA。

24. 配列番号1の71位～1615位のヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、又はその断片に対応する、請求項23記載の該siRNA。

25. ヌクレオチド配列の長さが8～30bpである、請求項23記載の該siRNA。

26. 下記配列番号10～14のヌクレオチド配列からなる群から選ばれた、ヌクレオチド配列からなる、請求項23記載のsiRNA：

5'-GCGTGGCTTCAGCATGGAATTCAAGAGATTCCATGCTGAAGCCACGCTTTT
10 TTGAAA-3'

(配列番号：10)

5'-GGGCTTTTCGAACAACAATATTCAAGAGATATTGTTGTTTCGAAAGCCCTTTTT
TGAAA-3'

(配列番号：11)

15 5'-GTTATGAGAAGTCTGACAAGTTCAAGAGACTTGTCAGACTTCTCATAATTT
TTTGAAA-3'

(配列番号：12)

5'-GATTCTTGGCTAAATCCCATTCAAGAGATGGGATTTAGCCAAGAATCTTTTT
TGAAA-3'

20 (配列番号：13)

及び

5'-GGACATTTGAACAACAGCATTCAAGAGATGCTGTTGTTCAAATGTCCTTTT
TTGAAA-3'

(配列番号：14)。

25 27. 配列番号1のヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、又はその断片に対応する、siRNA；及び配列番号1の71位～1615位のヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、又はその断片に対応する、siRNAを含む、ガン治療用医薬組成物。

28. 配列番号1のヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、又はその断片に対応する、siRNA；及び配列番号1の71位～1615位のヌクレオチド配列を

含むポリヌクレオチド、又はその断片に対応する、siRNA によって形質転換された細胞を含む、ガン治療用医薬組成物。

29. 該形質転換される細胞が、治療対象の患者から取り出された細胞である、請求項 28 記載の該ガン治療用医薬組成物。

5 30. ヒト細胞を準備し、かつ配列番号 1 のヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、又はその断片に対応する、siRNA；又は配列番号 1 の 71 位～1615 位のヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、又はその断片に対応する、siRNA によって形質転換することを含む、ガン治療用細胞の製造方法。

31. 該ヒト細胞が、治療対象の患者から取り出された細胞である、請求項 10 30 の該製造方法。

32. Nox1 遺伝子を標的とするガン細胞増殖抑制物質のスクリーニング方法であって、突然変異 Ras 遺伝子を有する細胞を、Nox1 遺伝子でトランスフェクションし、該形質転換細胞をスクリーニング対象物質と接触させた後、Nox1 遺伝子の発現及び Nox1 活性の不活化を検出することを含む、該スクリーニング 15 方法。

33. 該形質転換細胞を、スクリーニング対象物質とともに培養することを含む、請求項 32 記載の該スクリーニング方法。

34. Nox1 遺伝子の発現を、リアルタイム定量的ポリメラーゼ連鎖反応による mRNA の検出、又は抗体による Nox1 遺伝子にコードされたポリペプチド、 20 又はそのペプチド断片の検出により行う、請求項 32 記載の該スクリーニング方法。

35. Nox1 遺伝子の発現を、その形質転換細胞の形態変化を観察することにより行う、請求項 32 記載の該スクリーニング方法。

36. 該突然変異 Ras 遺伝子を有する細胞が、H-Ras-NIH3T3 細胞、又は 25 K-Ras-NRK 細胞である、請求項 32 記載の該スクリーニング方法。

37. pEGFP-C1 (K-Ras-NRK/GFP)、又は pEGFP-C1-Nox1 (K-Ras-NRK/GFP-Nox1) を用いて Nox1 遺伝子のトランスフェクションを行う、請求項 32 記載の該スクリーニング方法。

38. Nox1 遺伝子でトランスフェクションされた、突然変異 Ras 遺伝子を有 30 する細胞。

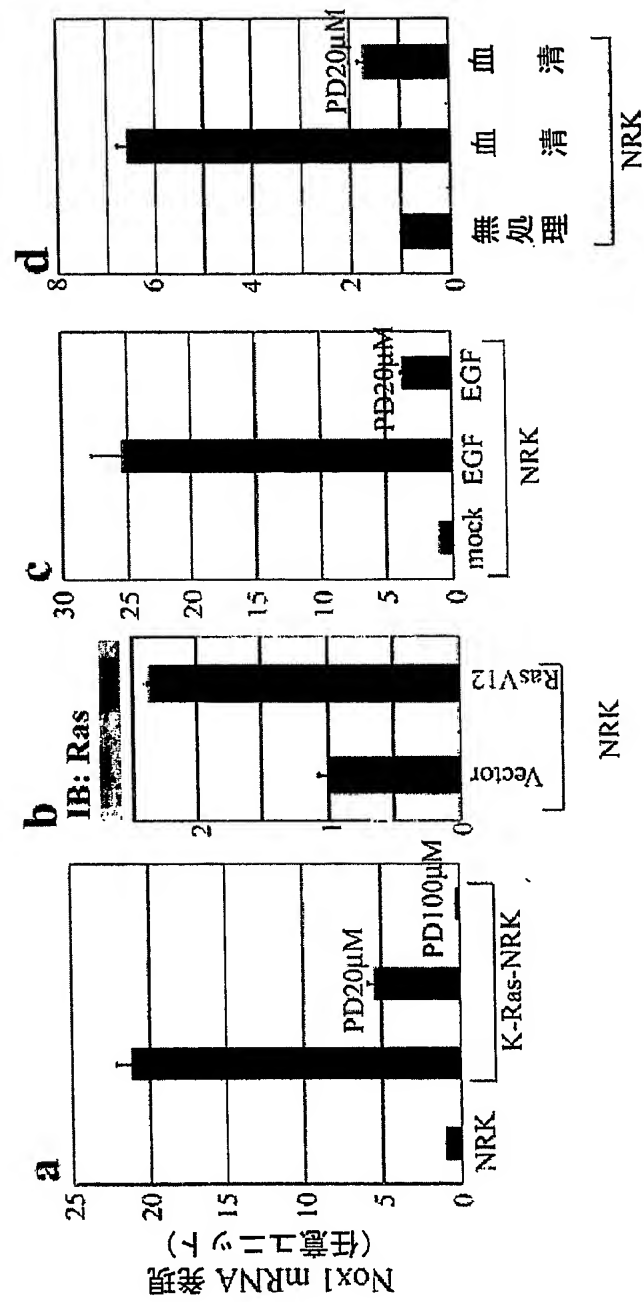


図 1

2

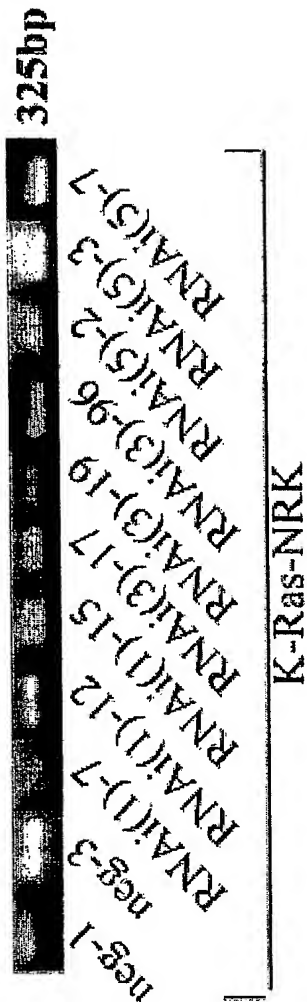


図 3

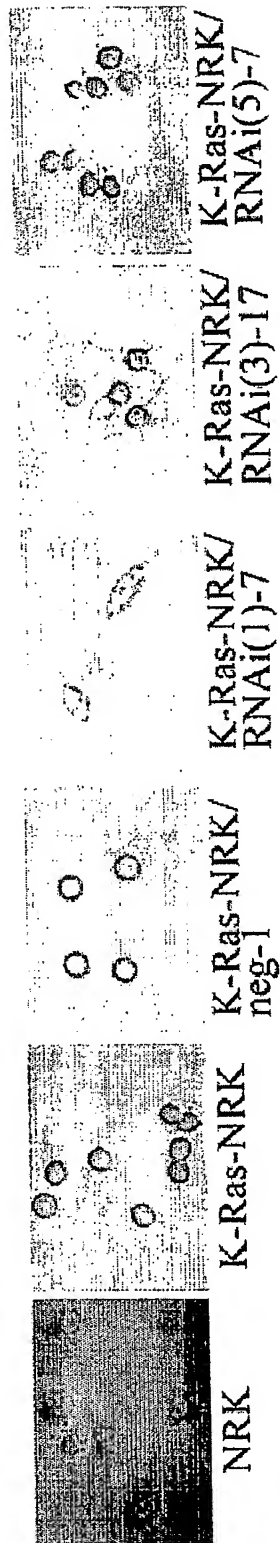


図 4

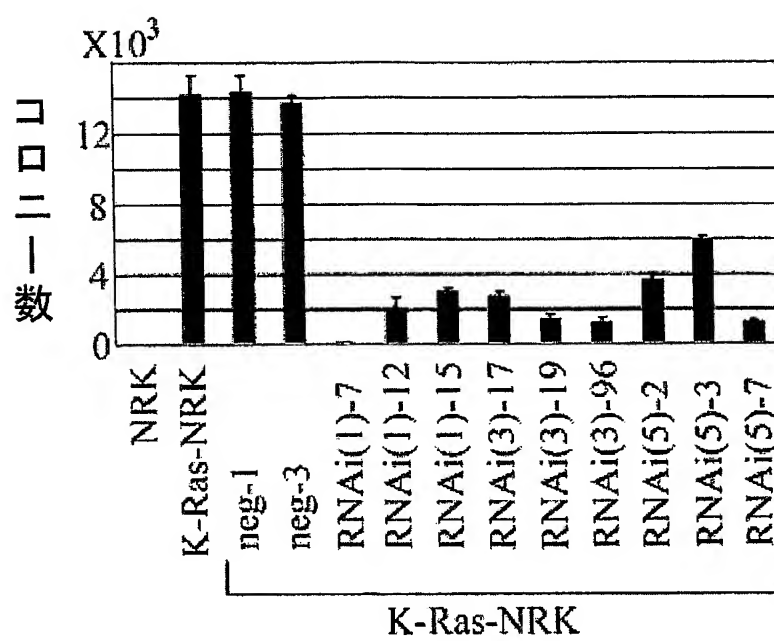


図 5

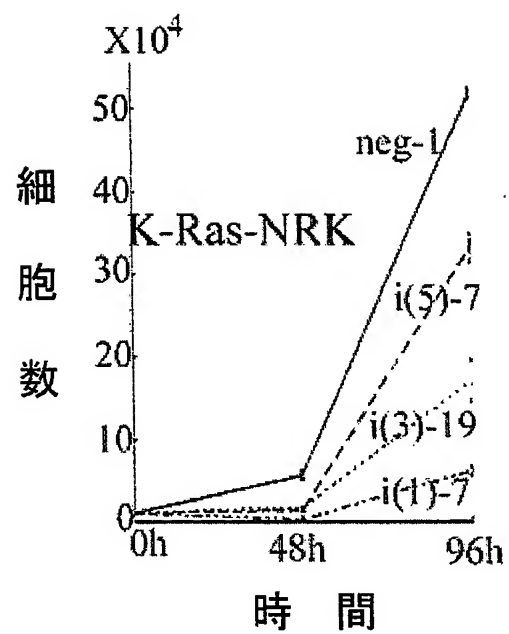


図 6

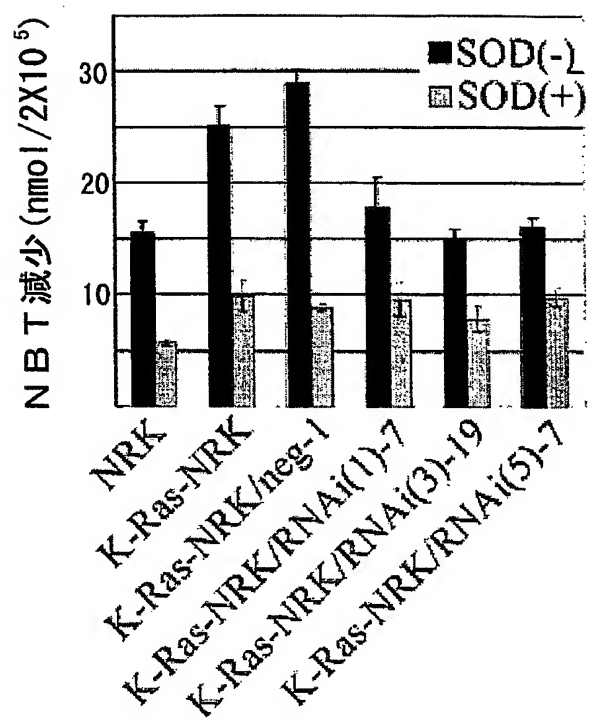
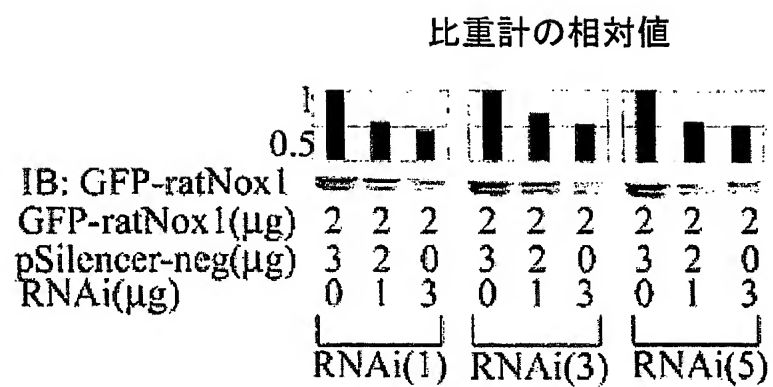


図 7



8

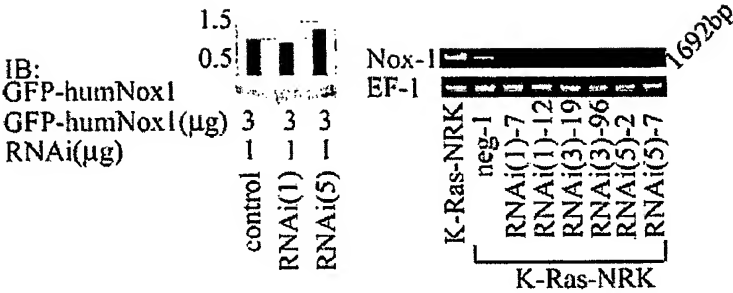


図 9

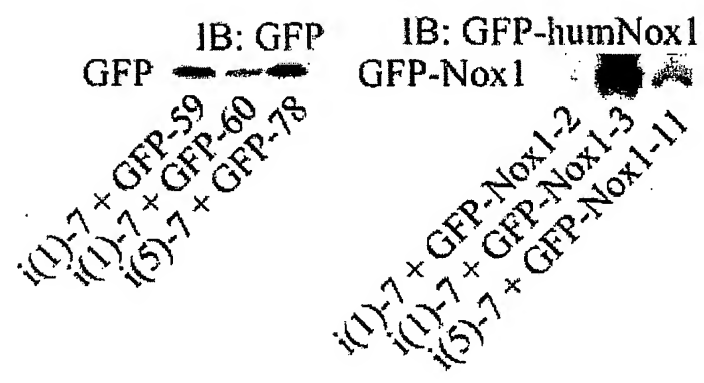


図 10

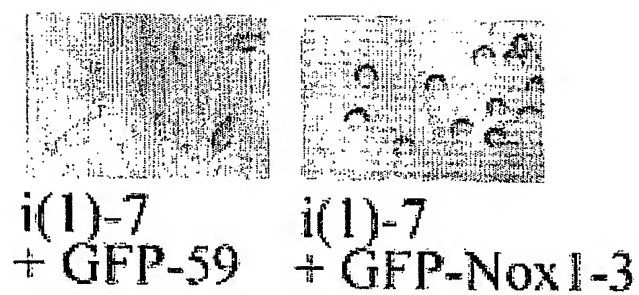


図 1 1

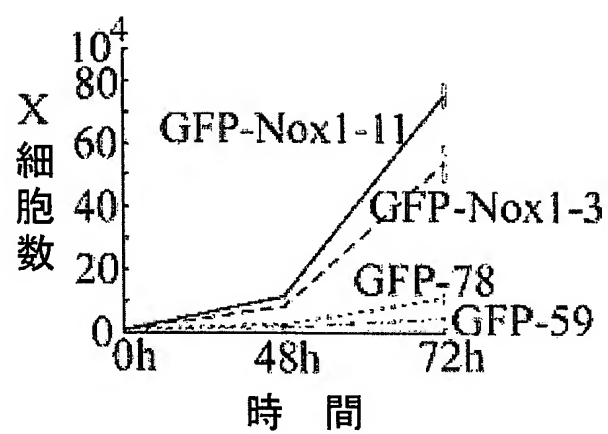


図 1 2

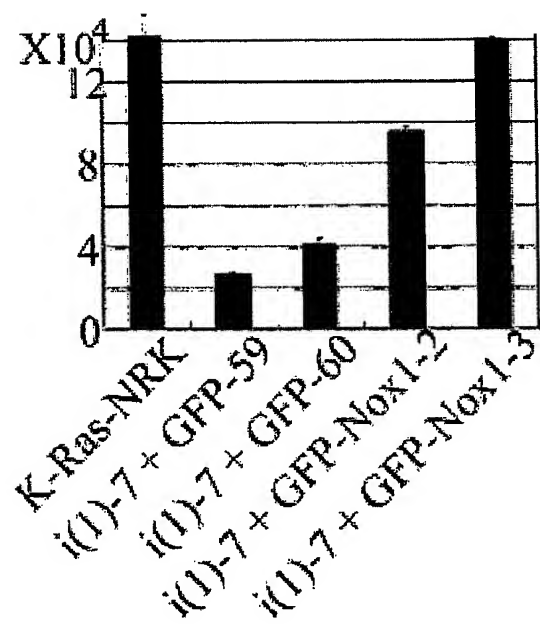


図 13

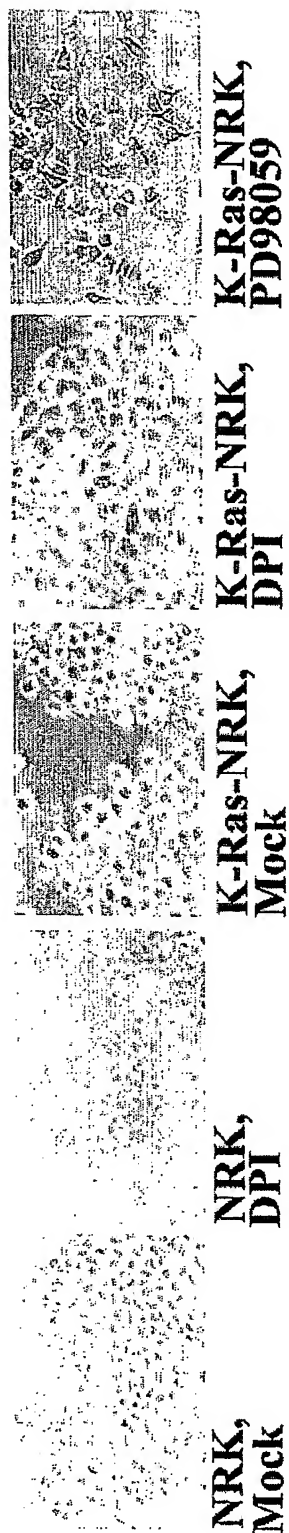
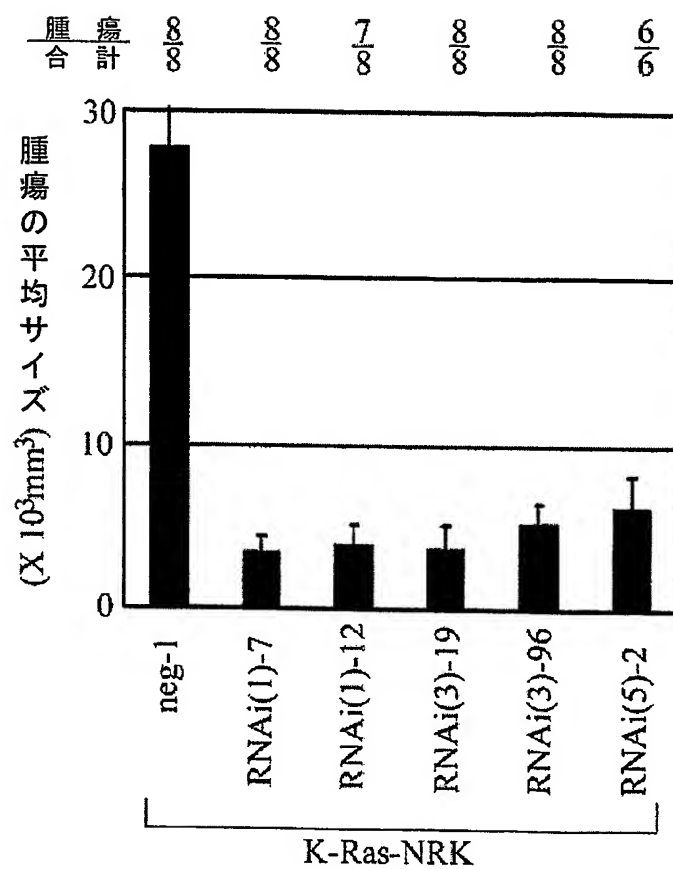


図 1 4



WO 2005/021739

PCT/JP2004/011673

SEQUENCE LISTING

<110> Kureha Chemical Industry Company, Limited
KAMATA, Toru
5 MITSUSHITA, Junji

<120> Antibodies to Nox1 polypeptide, method for the detection of cancer using Nox1 gene and method for screening substances suppressing cancer growth

10 <130> 0701012W01
<160> 27
<170> PatentIn version 3.1

15 <210> 1
<211> 1734
<212> DNA
<213> Homo sapiens

20 <220>
<221> GDS
<222> (71).. (1618)

25 <223> Human Nox1 polypeptide of SEQ NO:2

<400> 1
ggacctctcc agaatccgga ttgctgaatc ttccctgttg cctagaaggg ctccaaacca 60

30 cctcttgaca atg gga aac tgg gtg gtt aac cac tgg ttt tca gtt ttg 109
Met Gly Asn Trp Val Val Asn His Trp Phe Ser Val Leu
1 5 10

35 ttt ctg gtt gtt tgg tta ggg ctg aat gtt ttc ctg ttt gtg gat gcc 157
Phe Leu Val Val Trp Leu Gly Leu Asn Val Phe Leu Phe Val Asp Ala
15 20 25

40 ttc ctg aaa tat gag aag gcc gac aaa tac tac tac aca aga aaa atc 205
Phe Leu Lys Tyr Glu Lys Ala Asp Lys Tyr Tyr Tyr Thr Arg Lys Ile
30 35 40 45

	ctt ggg tca aca ttg gcc tgt gcc cga gcg tct gct ctc tgc ttg aat	253
	Leu Gly Ser Thr Leu Ala Cys Ala Arg Ala Ser Ala Leu Cys Leu Asn	
	50 55 60	
5	ttt aac agc acg ctg atc ctg ctt cct gtg tgt cgc aat ctg ctg tcc	301
	Phe Asn Ser Thr Leu Ile Leu Leu Pro Val Cys Arg Asn Leu Leu Ser	
	65 70 75	
	ttc ctg agg ggc acc tgc tca ttt tgc agc cgc aca ctg aga aag caa	349
10	Phe Leu Arg Gly Thr Cys Ser Phe Cys Ser Arg Thr Leu Arg Lys Gln	
	80 85 90	
	ttg gat cac aac ctc acc ttc cac aag ctg gtg gcc tat atg atc tgc	397
	Leu Asp His Asn Leu Thr Phe His Lys Leu Val Ala Tyr Met Ile Cys	
15	95 100 105	
	cta cat aca got att cac atc att gca cac ctg ttt aac ttt gac tgc	445
	Leu His Thr Ala Ile His Ile Ile Ala His Leu Phe Asn Phe Asp Cys	
	110 115 120 125	
20	tat agc aga agc cga cag gcc aca gat ggc tcc ctt gcc tcc att ctc	493
	Tyr Ser Arg Ser Arg Gln Ala Thr Asp Gly Ser Leu Ala Ser Ile Leu	
	130 135 140	
25	tcc agc cta tct cat gat gag aaa aag ggg ggt tct tgg cta aat ccc	541
	Ser Ser Leu Ser His Asp Glu Lys Lys Gly Gly Ser Trp Leu Asn Pro	
	145 150 155	
	atc cag tcc cga aac acg aca gtg gag tat gtg aca ttc acc agc att	589
30	Ile Gln Ser Arg Asn Thr Thr Val Glu Tyr Val Thr Phe Thr Ser Ile	
	160 165 170	
	gct ggt ctc act gga gtg atc atg aca ata gcc ttg att ctc atg gta	637
	Ala Gly Leu Thr Gly Val Ile Met Thr Ile Ala Leu Ile Leu Met Val	
35	175 180 185	
	act tca gct act gag ttc atc cgg agg agt tat ttt gaa gtc ttc tgg	685
	Thr Ser Ala Thr Glu Phe Ile Arg Arg Ser Tyr Phe Glu Val Phe Trp	
	190 195 200 205	
40	tat act cac cac ctt ttt atc ttc tat atc ctt ggc tta ggg att cac	733

	Tyr Thr His His Leu Phe Ile Phe Tyr Ile Leu Gly Leu Gly Ile His	
	210 215 220	
	ggc att ggt gga att gtc cgg ggt caa aca gag gag agc atg aat gag	781
5	Gly Ile Gly Gly Ile Val Arg Gly Gln Thr Glu Glu Ser Met Asn Glu	
	225 230 235	
	agt cat cct cgc aag tgt gca gag tct ttt gag atg tgg gat gat cgt	829
10	Ser His Pro Arg Lys Cys Ala Glu Ser Phe Glu Met Trp Asp Asp Arg	
	240 245 250	
	gac tcc cac tgt agg cgc cct aag ttt gaa ggg cat ccc cct gag tct	877
15	Asp Ser His Cys Arg Arg Pro Lys Phe Glu Gly His Pro Pro Glu Ser	
	255 260 265	
	tgg aag tgg atc ctt gca ccg gtc att ctt tat atc tgt gaa agg atc	925
	Trp Lys Trp Ile Leu Ala Pro Val Ile Leu Tyr Ile Cys Glu Arg Ile	
	270 275 280 285	
20	ctc cgg ttt tac cgc tcc cag cag aag gtt gtg att acc aag gtt gtt	973
	Leu Arg Phe Tyr Arg Ser Gln Gln Lys Val Val Ile Thr Lys Val Val	
	290 295 300	
	atg cac cca tcc aaa gtt ttg gaa ttg cag atg aac aag cgt ggc ttc	1021
25	Met His Pro Ser Lys Val Leu Glu Leu Gln Met Asn Lys Arg Gly Phe	
	305 310 315	
	agc atg gaa gtg ggg cag tat atc ttt gtt aat tgc ccc tca atc tot	1069
30	Ser Met Glu Val Gly Gln Tyr Ile Phe Val Asn Cys Pro Ser Ile Ser	
	320 325 330	
	ctc ctg gaa tgg cat cct ttt act ttg acc tct gct cca gag gaa gat	1117
35	Leu Leu Glu Trp His Pro Phe Thr Leu Thr Ser Ala Pro Glu Glu Asp	
	335 340 345	
	ttc ttc tcc att cat atc cga gca gca ggg gac tgg aca gaa aat ctc	1165
	Phe Phe Ser Ile His Ile Arg Ala Ala Gly Asp Trp Thr Glu Asn Leu	
	350 355 360 365	
40	ata agg gct ttc gaa caa caa tat tca cca att ccc agg att gaa gtg	1213
	Ile Arg Ala Phe Glu Gln Gln Tyr Ser Pro Ile Pro Arg Ile Glu Val	

	370	375	380	
	gat ggt ccc ttt ggc aca gcc agt gag gat gtt ttc cag tat gaa gtg			1261
	Asp Gly Pro Phe Gly Thr Ala Ser Glu Asp Val Phe Gln Tyr Glu Val			
5	385	390	395	
	gct gtg ctg gtt gga gca gga att ggg gtc acc ccc ttt gct tct atc			1309
	Ala Val Leu Val Gly Ala Gly Ile Gly Val Thr Pro Phe Ala Ser Ile			
	400	405	410	
10	ttg aaa tcc atc tgg tac aaa ttc cag tgt gca gac cac aac ctc aaa			1357
	Leu Lys Ser Ile Trp Tyr Lys Phe Gln Cys Ala Asp His Asn Leu Lys			
	415	420	425	
15	aca aaa aag gtt ggt cat gca gca tta aac ttt gac aag gcc act gac			1405
	Thr Lys Lys Val Gly His Ala Ala Leu Asn Phe Asp Lys Ala Thr Asp			
	430	435	440	445
	atc gtg aca ggt ctg aaa cag aaa acc tcc ttt ggg aga cca atg tgg			1453
20	Ile Val Thr Gly Leu Lys Gln Lys Thr Ser Phe Gly Arg Pro Met Trp			
	450	455	460	
	gac aat gag ttt tct aca ata gct acc tcc cac ccc aag tct gta gtg			1501
	Asp Asn Glu Phe Ser Thr Ile Ala Thr Ser His Pro Lys Ser Val Val			
25	465	470	475	
	gga gtt ttc tta tgt ggc cct cgg act ttg gca aag agc ctg cgc aaa			1549
	Gly Val Phe Leu Cys Gly Pro Arg Thr Leu Ala Lys Ser Leu Arg Lys			
	480	485	490	
30	tgc tgt cac cga tat tcc agt ctg gat cct aga aag gtt caa ttc tac			1597
	Cys Cys His Arg Tyr Ser Ser Leu Asp Pro Arg Lys Val Gln Phe Tyr			
	495	500	505	
35	ttc aac aaa gaa aat ttt tga gttataggaa taaggacggt aatctgcatt			1648
	Phe Asn Lys Glu Asn Phe			
	510	515		
	ttgtctcttt gtatcttcag taatttactt ggtctctgtca ggtttgagca gtcactttag			1708
40	gataagaatg tgccctctcaa gccttg			1734

<210> 2
 <211> 515
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2
 Met Gly Asn Trp Val Val Asn His Trp Phe Ser Val Leu Phe Leu Val
 10 1 5 10 15
 Val Trp Leu Gly Leu Asn Val Phe Leu Phe Val Asp Ala Phe Leu Lys
 20 25 30
 15 Tyr Glu Lys Ala Asp Lys Tyr Tyr Tyr Thr Arg Lys Ile Leu Gly Ser
 35 40 45
 Thr Leu Ala Cys Ala Arg Ala Ser Ala Leu Cys Leu Asn Phe Asn Ser
 50 55 60
 20 Thr Leu Ile Leu Leu Pro Val Cys Arg Asn Leu Leu Ser Phe Leu Arg
 65 70 75 80
 Gly Thr Cys Ser Phe Cys Ser Arg Thr Leu Arg Lys Gln Leu Asp His
 25 85 90 95
 Asn Leu Thr Phe His Lys Leu Val Ala Tyr Met Ile Cys Leu His Thr
 100 105 110
 30 Ala Ile His Ile Ile Ala His Leu Phe Asn Phe Asp Cys Tyr Ser Arg
 115 120 125
 Ser Arg Gln Ala Thr Asp Gly Ser Leu Ala Ser Ile Leu Ser Ser Leu
 130 135 140
 35 Ser His Asp Glu Lys Lys Gly Gly Ser Trp Leu Asn Pro Ile Gln Ser
 145 150 155 160
 Arg Asn Thr Thr Val Glu Tyr Val Thr Phe Thr Ser Ile Ala Gly Leu
 40 165 170 175

	Thr	Gly	Val	Ile	Met	Thr	Ile	Ala	Leu	Ile	Leu	Met	Val	Thr	Ser	Ala	
				180					185					190			
5	Thr	Glu	Phe	Ile	Arg	Arg	Ser	Tyr	Phe	Glu	Val	Phe	Trp	Tyr	Thr	His	
			195				200						205				
	His	Leu	Phe	Ile	Phe	Tyr	Ile	Leu	Gly	Leu	Gly	Ile	His	Gly	Ile	Gly	
		210				215						220					
10	Gly	Ile	Val	Arg	Gly	Gln	Thr	Glu	Glu	Ser	Met	Asn	Glu	Ser	His	Pro	
	225				230						235				240		
	Arg	Lys	Cys	Ala	Glu	Ser	Phe	Glu	Met	Trp	Asp	Asp	Arg	Asp	Ser	His	
				245					250				255				
15	Cys	Arg	Arg	Pro	Lys	Phe	Glu	Gly	His	Pro	Pro	Glu	Ser	Trp	Lys	Trp	
				260				265					270				
	Ile	Leu	Ala	Pro	Val	Ile	Leu	Tyr	Ile	Cys	Glu	Arg	Ile	Leu	Arg	Phe	
20		275				280						285					
	Tyr	Arg	Ser	Gln	Gln	Lys	Val	Val	Ile	Thr	Lys	Val	Val	Met	His	Pro	
	290				295						300						
25	Ser	Lys	Val	Leu	Glu	Leu	Gln	Met	Asn	Lys	Arg	Gly	Phe	Ser	Met	Glu	
	305			310						315				320			
	Val	Gly	Gln	Tyr	Ile	Phe	Val	Asn	Cys	Pro	Ser	Ile	Ser	Leu	Leu	Glu	
			325					330				335					
30	Trp	His	Pro	Phe	Thr	Leu	Thr	Ser	Ala	Pro	Glu	Glu	Asp	Phe	Phe	Ser	
			340					345				350					
	Ile	His	Ile	Arg	Ala	Ala	Gly	Asp	Trp	Thr	Glu	Asn	Leu	Ile	Arg	Ala	
35		355				360					365						
	Phe	Glu	Gln	Gln	Tyr	Ser	Pro	Ile	Pro	Arg	Ile	Glu	Val	Asp	Gly	Pro	
	370				375					380							
40	Phe	Gly	Thr	Ala	Ser	Glu	Asp	Val	Phe	Gln	Tyr	Glu	Val	Ala	Val	Leu	
	385			390					395					400			

Val Gly Ala Gly Ile Gly Val Thr Pro Phe Ala Ser Ile Leu Lys Ser
 405 410 415
 5 Ile Trp Tyr Lys Phe Gln Cys Ala Asp His Asn Leu Lys Thr Lys Lys
 420 425 430
 Val Gly His Ala Ala Leu Asn Phe Asp Lys Ala Thr Asp Ile Val Thr
 435 440 445
 10 Gly Leu Lys Gln Lys Thr Ser Phe Gly Arg Pro Met Trp Asp Asn Glu
 450 455 460
 Phe Ser Thr Ile Ala Thr Ser His Pro Lys Ser Val Val Gly Val Phe
 15 465 470 475 480
 Leu Cys Gly Pro Arg Thr Leu Ala Lys Ser Leu Arg Lys Cys Cys His
 485 490 495
 20 Arg Tyr Ser Ser Leu Asp Pro Arg Lys Val Gln Phe Tyr Phe Asn Lys
 500 505 510
 Glu Asn Phe
 515
 25
 <210> 3
 <211> 2577
 <212> DNA
 30 <213> Rattus norvegicus
 <220>
 <221> CDS
 <222> (128).. (1819)
 35 <223> Rat Nox1 polypeptide of SEQ NO:4
 <400> 3
 ttctgagtag gtgtgcattt gagggtcata aagacatata tcttgagcta gacagaagtt 60
 40 cctatcctga aggatcccat cagagaaacc agattgctcc taaggagctc cagacctcca 120

	tttgaca atg gga aac tgg ctg gtt aac cac tgg ctc tca gtt ttg ttt	169
	Met Gly Asn Trp Leu Val Asn His Trp Leu Ser Val Leu Phe	
	1 5 10	
5	ctg gtt tct tgg ttg ggg ctg aac att ttt ctg ttt gtg tac gtc ttc	217
	Leu Val Ser Trp Leu Gly Leu Asn Ile Phe Leu Phe Val Tyr Val Phe	
	15 20 25 30	
10	ctg aat tat gag aag tct gac aag tac tat tac acg aga gaa att ctc	265
	Leu Asn Tyr Glu Lys Ser Asp Lys Tyr Tyr Tyr Thr Arg Glu Ile Leu	
	35 40 45	
	gga act gcc ttg gcc ttg gcc aga gca tct gct ttg tgc ctg aat ttt	313
15	Gly Thr Ala Leu Ala Leu Ala Arg Ala Ser Ala Leu Cys Leu Asn Phe	
	50 55 60	
	aac agc atg gtg atc ctg att cct gtg tgt cga aat ctg ctc tcc ttc	361
	Asn Ser Met Val Ile Leu Ile Pro Val Cys Arg Asn Leu Leu Ser Phe	
20	65 70 75	
	ctg agg ggc acc tgc tca ttt tgc aac cac acg ctg aga aag cca ttg	409
	Leu Arg Gly Thr Cys Ser Phe Cys Asn His Thr Leu Arg Lys Pro Leu	
	80 85 90	
25	gat cac aac ctc acc ttc cat aag ctg gtg gca tat atg atc tgc ata	457
	Asp His Asn Leu Thr Phe His Lys Leu Val Ala Tyr Met Ile Cys Ile	
	95 100 105 110	
30	ttc aca got att cat atc att gca cat cta ttt aac ttt gaa cgc tac	505
	Phe Thr Ala Ile His Ile Ile Ala His Leu Phe Asn Phe Glu Arg Tyr	
	115 120 125	
	agt aga agc caa cag gcc atg gat gga tot ctt gcc tct gtt ctc tcc	553
35	Ser Arg Ser Gln Gln Ala Met Asp Gly Ser Leu Ala Ser Val Leu Ser	
	130 135 140	
	agc cta ttc cat ccc gag aaa gaa gat tct tgg cta aat ccc atc cag	601
	Ser Leu Phe His Pro Glu Lys Glu Asp Ser Trp Leu Asn Pro Ile Gln	
40	145 150 155	

	tct cca aac gtg aca gtg atg tat gca goa ttt acc agt att gct ggc	649
	Ser Pro Asn Val Thr Val Met Tyr Ala Ala Phe Thr Ser Ile Ala Gly	
	160 165 170	
5	ctt act gga gtg gtc gcc act gtg gct ttg gtt ctc atg gta act tca	697
	Leu Thr Gly Val Val Ala Thr Val Ala Leu Val Leu Met Val Thr Ser	
	175 180 185 190	
	gct atg gag ttt atc cgc agg aat tat ttt gag ctc ttc tgg tat aca	745
10	Ala Met Glu Phe Ile Arg Arg Asn Tyr Phe Glu Leu Phe Trp Tyr Thr	
	195 200 205	
	cat cac ctt ttc atc atc tat atc atc tgc tta ggg atc cat ggc ctg	793
	His His Leu Phe Ile Ile Tyr Ile Ile Cys Leu Gly Ile His Gly Leu	
15	210 215 220	
	ggg ggg att gtc cgg ggt caa aca gaa gag agc atg agt gaa agt cat	841
	Gly Gly Ile Val Arg Gly Gln Thr Glu Glu Ser Met Ser Glu Ser His	
	225 230 235	
20	ccc cgc aac tgt tca tac tct ttc cac gag tgg gat aag tat gaa agg	889
	Pro Arg Asn Cys Ser Tyr Ser Phe His Glu Trp Asp Lys Tyr Glu Arg	
	240 245 250	
25	agt tgc agg agt cct cat ttt gtg ggg caa ccc cct gag tct tgg aag	937
	Ser Cys Arg Ser Pro His Phe Val Gly Gln Pro Pro Glu Ser Trp Lys	
	255 260 265 270	
	tgg atc ctc gcg ccg att gct ttt tat atc ttt gaa agg atc ctt cgc	985
30	Trp Ile Leu Ala Pro Ile Ala Phe Tyr Ile Phe Glu Arg Ile Leu Arg	
	275 280 285	
	ttt tat cgc tcc cgg cag aag gtc gtg att acc aag gtt gtc atg cac	1033
	Phe Tyr Arg Ser Arg Gln Lys Val Val Ile Thr Lys Val Val Met His	
35	290 295 300	
	cca tgt aaa gtt ttg gaa ttg cag atg agg aag cgg ggc ttt act atg	1081
	Pro Cys Lys Val Leu Glu Leu Gln Met Arg Lys Arg Gly Phe Thr Met	
	305 310 315	
40	gga ata gga cag tat ata ttc gta aat tgc ccc tcg att tcc ttc ctg	1129

10/21

	480	485	490	
	ctg aca ggt ctg aaa cag aaa acc tcc ttt ggg aga cca atg tgg gac	1657		
	Leu Thr Gly Leu Lys Gln Lys Thr Ser Phe Gly Arg Pro Met Trp Asp			
5	495	500	505	510
	aat gag ttt tct aga ata gct act gcc cac ccc aag tct gtg gtg ggg	1705		
	Asn Glu Phe Ser Arg Ile Ala Thr Ala His Pro Lys Ser Val Val Gly			
	515	520	525	
10				
	gtt ttc tta tgc ggc cct ccg act ttg gca aaa agc ctg cgc aaa tgc	1753		
	Val Phe Leu Cys Gly Pro Pro Thr Leu Ala Lys Ser Leu Arg Lys Cys			
	530	535	540	
15				
	tgt cgg cgg tac tca agt ctg gat cct agg aag gtt caa ttc tac ttc	1801		
	Cys Arg Arg Tyr Ser Ser Leu Asp Pro Arg Lys Val Gln Phe Tyr Phe			
	545	550	555	
	aac aaa gaa acg ttc tga attggaggaa gccgcacagt agtaattctc	1849		
20	Asn Lys Glu Thr Phe			
	560			
	catcttcctt ttactaaag tgtgggtcag ctactagata gtccgttgto gcacaaggac	1909		
25				
	ttactccca tcttaaagtt gaotcaactc catcattctt gggttttggc aacatgagag	1969		
	ctgcataact cacaattgca aaacacatga attattattg gggggattgt aaatccttct	2029		
	gggaaacctg ccttagctg aatottgctg gttgacactt gcacaattta acotcaggtg	2089		
30				
	tottggttga tacctgataa tcttccctcc cacctgtccc tcacagaaga tttctaagta	2149		
	gggtgatttt aaaatattta ttgaatccac gacaaaacaa taatcataaa taataaacat	2209		
35				
	aaaattacca agattccac tcccatatca taccactaa gaacatcgtt atacatgagc	2269		
	ttatcatcca gtgtgaccaa caatttatac ttactgtgc caaaataatc ttcattttg	2329		
	cttattgaac aattttgctg actttcccta gtaatatctt aagtatatta actggaatca	2389		
40				
	aatttgtatt atagttagaa gccaaactata ttgccagttt gtattgtttg aaataactgg	2449		

aaaggcctga cctacatcgt ggggtaattt aacagaagct ctttccattt ttgttggtg 2509
 ttgttaaaga gttttgttta tgaatgtgtt ataaaaagaa aataaaaagt tataattttg 2569
 5 acggaaaa 2577

<210> 4
 10 <211> 563
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus

<400> 4
 15 Met Gly Asn Trp Leu Val Asn His Trp Leu Ser Val Leu Phe Leu Val
 1 5 10 15
 Ser Trp Leu Gly Leu Asn Ile Phe Leu Phe Val Tyr Val Phe Leu Asn
 20 20 25 30
 Tyr Glu Lys Ser Asp Lys Tyr Tyr Tyr Thr Arg Glu Ile Leu Gly Thr
 35 40 45
 Ala Leu Ala Leu Ala Arg Ala Ser Ala Leu Cys Leu Asn Phe Asn Ser
 25 50 55 60
 Met Val Ile Leu Ile Pro Val Cys Arg Asn Leu Leu Ser Phe Leu Arg
 65 70 75 80
 Gly Thr Cys Ser Phe Cys Asn His Thr Leu Arg Lys Pro Leu Asp His
 30 85 90 95
 Asn Leu Thr Phe His Lys Leu Val Ala Tyr Met Ile Cys Ile Phe Thr
 100 105 110
 35 Ala Ile His Ile Ile Ala His Leu Phe Asn Phe Glu Arg Tyr Ser Arg
 115 120 125
 Ser Gln Gln Ala Met Asp Gly Ser Leu Ala Ser Val Leu Ser Ser Leu
 40 130 135 140

Phe His Pro Glu Lys Glu Asp Ser Trp Leu Asn Pro Ile Gln Ser Pro
 145 150 155 160

Asn Val Thr Val Met Tyr Ala Ala Phe Thr Ser Ile Ala Gly Leu Thr
 5 165 170 175

Gly Val Val Ala Thr Val Ala Leu Val Leu Met Val Thr Ser Ala Met
 180 185 190

10 Glu Phe Ile Arg Arg Asn Tyr Phe Glu Leu Phe Trp Tyr Thr His His
 195 200 205

Leu Phe Ile Ile Tyr Ile Ile Cys Leu Gly Ile His Gly Leu Gly Gly
 210 215 220

15 Ile Val Arg Gly Gln Thr Glu Glu Ser Met Ser Glu Ser His Pro Arg
 225 230 235 240

Asn Cys Ser Tyr Ser Phe His Glu Trp Asp Lys Tyr Glu Arg Ser Cys
 20 245 250 255

Arg Ser Pro His Phe Val Gly Gln Pro Pro Glu Ser Trp Lys Trp Ile
 260 265 270

25 Leu Ala Pro Ile Ala Phe Tyr Ile Phe Glu Arg Ile Leu Arg Phe Tyr
 275 280 285

Arg Ser Arg Gln Lys Val Val Ile Thr Lys Val Val Met His Pro Cys
 290 295 300

30 Lys Val Leu Glu Leu Gln Met Arg Lys Arg Gly Phe Thr Met Gly Ile
 305 310 315 320

Gly Gln Tyr Ile Phe Val Asn Cys Pro Ser Ile Ser Phe Leu Glu Trp
 35 325 330 335

His Pro Phe Thr Leu Thr Ser Ala Pro Glu Glu Glu Phe Phe Ser Ile
 340 345 350

40 His Ile Arg Ala Ala Gly Asp Trp Thr Glu Asn Leu Ile Arg Thr Phe
 355 360 365

Glu Gln Gln His Ser Pro Met Pro Arg Ile Glu Val Asp Gly Pro Phe
 370 375 380

5 Gly Thr Val Ser Glu Asp Val Phe Gln Tyr Glu Val Ala Val Leu Val
 385 390 395 400

Gly Ala Gly Ile Gly Val Thr Pro Phe Ala Ser Phe Leu Lys Ser Ile
 405 410 415

10 Trp Tyr Lys Phe Gln Arg Ala His Asn Lys Leu Lys Thr Gln Lys Ile
 420 425 430

Tyr Phe Tyr Trp Ile Cys Arg Glu Thr Gly Ala Phe Ala Trp Phe Asn
 15 435 440 445

Asn Leu Leu Asn Ser Leu Glu Gln Glu Met Asp Glu Leu Gly Lys Pro
 450 455 460

20 Asp Phe Leu Asn Tyr Arg Leu Phe Leu Thr Gly Trp Asp Ser Asn Ile
 465 470 475 480

Ala Gly His Ala Ala Leu Asn Phe Asp Arg Ala Thr Asp Val Leu Thr
 485 490 495

25 Gly Leu Lys Gln Lys Thr Ser Phe Gly Arg Pro Met Trp Asp Asn Glu
 500 505 510

Phe Ser Arg Ile Ala Thr Ala His Pro Lys Ser Val Val Gly Val Phe
 30 515 520 525

Leu Cys Gly Pro Pro Thr Leu Ala Lys Ser Leu Arg Lys Cys Cys Arg
 530 535 540

35 Arg Tyr Ser Ser Leu Asp Pro Arg Lys Val Gln Phe Tyr Phe Asn Lys
 545 550 555 560

Glu Thr Phe

40

<210> 5

<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

5 <220>
<223> Forward primer for Nox1 gene

<400> 5
ggagcaggaa ttggggtcac 20

10

<210> 6
<211> 20
<212> DNA
15 <213> Artificial sequence

<220>
<223> Reverse primer for Nox1 gene

20 <400> 6
ttgctgtccc atccggtgag 20

<210> 7
25 <211> 21
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
30 <223> Forward primer for human Nox1 gene

<400> 7
ccactgtagg cgcctaagt t 21

35

<210> 8
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

40 <220>

<223> Reverse primer for human Nox1 gene

<400> 8
aagaatgacc ggtgcaagga 20

5

<210> 9
<211> 25
<212> DNA
10 <213> Artificial sequence

<220>
<223> TaqMan probe

15 <400> 9
aagggcaccc cctgagttc tggaa 25

<210> 10
20 <211> 58
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
25 <223> siRNA for human Nox1 gene

<400> 10
gcgtggcttc agcatggaat tcaagagatt ccatgtgaa gccacgcttt ttggaaa 58

30

<210> 11
<211> 58
<212> DNA
<213> Artificial sequence

35

<220>
<223> siRNA for human Nox1 gene

<400> 11
40 gggctttcga acaacaatat tcaagagata ttgtgttcg aaagcccttt ttggaaa 58

- <210> 12
<211> 59
<212> DNA
5 <213> Artificial sequence
- <220>
<223> siRNA for rat Nox1 gene
- 10 <400> 12
gttatgagaa gtotgacaag ttcaagagac ttgtcagact totcataatt ttttgaaa 59
- <210> 13
15 <211> 58
<212> DNA
<213> Artificial sequence
- <220>
20 <223> siRNA for rat Nox1 gene
- <400> 13
gattotttggc taaatcccat tcaagagatg ggatttagcc aagaatcttt ttttgaaa 58
- 25
- <210> 14
<211> 58
<212> DNA
<213> Artificial sequence
- 30
- <220>
<223> siRNA for rat Nox1 gene
- <400> 14
35 ggacatttga acaacagcat tcaagagatg ctgttgttca aatgtccttt ttttgaaa 58
- <210> 15
<211> 20
40 <212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
 <223> Forward primer for Nox1 gene

5 <400> 15
 ggtcactccc ttgcttcca 20

<210> 16
 10 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 15 <223> Reverse primer for rat Nox1 gene

<400> 16
 ggcaaaggca cctgtctctc t 21

20
 <210> 17
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

25
 <220>
 <223> TaqManMGB probe

<400> 17
 30 tccagtagaa atagatcttt 20

<210> 18
 <211> 65
 <212> DNA
 35 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> siRNA construction

40 <400> 18
 gatcccggtta tgagaagtct gacaagttca agagacttgt cagacttctc ataattttt 60

ggaaa 65

5 <210> 19
<211> 65
<212> DNA
<213> Artificial sequence

10 <220>
<223> siRNA construction

<400> 19
agottttcca aaaaattatg agaagtctga caagtctctt gaacttgta gacttctcat 60

15 aacgg 65

<210> 20
20 <211> 64
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
25 <223> siRNA construction

<400> 20
gatcccgatt cttggctaaa tccattcaa gagatgggat ttagccaaga atcttttttg 60

30 gaaa 64

<210> 21
<211> 64
35 <212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> siRNA construction

40 <400> 21

agcttttcca aaaaagattc ttggctaaat cccatctott gaatgggatt tagccaagaa 60

togg 64

5

<210> 22

<211> 64

<212> DNA

<213> Artificial sequence

10

<220>

<223> siRNA construction

<400> 22

15 gatcccgac atttgaacaa cagcattcaa gagatgctgt tgttcaaag ttcttttttg 60

gaaa 64

20 <210> 23

<211> 64

<212> DNA

<213> Artificial sequence

25 <220>

<223> siRNA construction

<400> 23

agcttttcca aaaaaggaca ttgaacaac agcatctott gaatgctgt gttcaaagt 60

30 ccgg 64

<210> 24

35 <211> 17

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

40 <223> M13 primer

<400> 24
gttttccag tcaagac 17

5 <210> 25
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial sequence

10 <220>
<223> 3.0 Rev primer

<400> 25
gagttagctc actcattagg c 21

15

<210> 26
<211> 19
<212> DNA
20 <213> Artificial sequence

<220>
<223> Forward primer for Nox1 gene

25 <400> 26
atgggaaact ggotggtta 19

<210> 27
30 <211> 21
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
35 <223> Reverse primer for Nox1 gene

<400> 27
tcagaacgtt tctttgttga a 21

VIII-5-1	不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て(規則4.17(v)及び51の2.1(a)(v)) 氏名(姓名)	本国際出願 に関し、 呉羽化学工業株式会社 は、本国際出願の請求項に記載された対象が以下のよう に開示されたことを申し立てる。
VIII-5-1(i)	開示の種類:	刊行物
VIII-5-1(ii)	開示の日付:	2003年 08月 25日 (25. 08. 2003)
VIII-5-1(iii)	開示の名称:	日本癌学会総会記事 (第 6 2 回総会)
VIII-5-1(iv)	開示の場所:	名古屋
VIII-5-1(v)	本申立ては、次の指定国のためになされたものである。:	国内特許又は広域特許のための JP KR の指定

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/011673

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N9/02, C12N15/53, C12N5/10, C12Q1/02, C07K16/18, C12Q1/68, C07K16/40, C07K16/46, C12P21/08, A61K31/7105, A61K35/12, A61K39/395, A61K48/00, A61P35/00, G01N33/15, G01N33/50, G01N33/53, G01N33/566

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N9/02, C12N15/53, C12N5/10, C12Q1/02, C07K16/18, C12Q1/68, C07K16/40, C07K16/46, C12P21/08, A61K31/7105, A61K35/12, A61K39/395, A61K48/00, A61P35/00, G01N33/15, G01N33/50, G01N33/53, G01N33/566

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus(JOIS), SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 02/081703 A2 (Emory University), 17 October, 2002 (17.10.02), Seq. No. 14 & US 2002/0176852 A1 & EP 1399565 A2	1-31
X	WO 02/103028 A2 (Biomedical Center), 27 December, 2002 (27.12.02), Seq. No.176 & EP 1446757 A2 & US 2003/0108890 A1	1-31

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
14 October, 2004 (14.10.04)

Date of mailing of the international search report
02 November, 2004 (02.11.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/011673

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
(See extra sheet.)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-31

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/011673

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

Claims 1 to 31 relate to Nox-1 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:2, while claims 32 to 38 relate to Nox gene.

However, it is not stated that the Nox gene according to claims 32 to 38 is Nox-1 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:2. As the results of the search, it is clarified that Nox gene is not novel because of having been reported in document [WO 02/081703 A2 (Emory University) 17 October, 2002 (17.10.02)] and so on.

Thus, Nox gene falls within the category of prior art and, therefore, the above common matter cannot be regarded as a special technical feature in the meaning within the second sentence of PCT Rule 13.2.

Accordingly, there is no matter common to all claims.

Since there is no other matter seemingly being a special technical feature in the meaning within the second sentence of PCT Rule 13.2, no technical relevancy can be found out between these invention groups differing from each other in the meaning within PCT Rule 13.

Such being the case, it is obvious that claims 1 to 38 do not comply with the requirement of unity of invention.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. ⁷ C12N9/02, C12N15/53, C12N5/10, C12Q1/02, C07K16/18, C12Q1/68, C07K16/40, C07K16/46, C12P21/08, A61K31/7105, A61K35/12, A61K39/395, A61K48/00, A61P35/00, G01N33/15, G01N33/50, G01N33/53, G01N33/566

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. ⁷ C12N9/02, C12N15/53, C12N5/10, C12Q1/02, C07K16/18, C12Q1/68, C07K16/40, C07K16/46, C12P21/08, A61K31/7105, A61K35/12, A61K39/395, A61K48/00, A61P35/00, G01N33/15, G01N33/50, G01N33/53, G01N33/566

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus (JOIS) SwissProt/PIR/GeneSeq Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 02/081703 A2 (Emory University) 2002.10.17, seq. 14 & US 2002/0176852 A1 & EP 1399565 A2	1-31
X	WO 02/103028 A2 (Biomedical Center) 2002.12.27, seq. 176 & EP 1446757 A2 & US 2003/0108890 A1	1-31

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリ

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

14.10.2004

国際調査報告の発送日

02.11.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

鈴木 恵理子

4N

3126

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

(特別ページ参照)

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

1-31

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

請求の範囲1-31は、配列番号2のアミノ酸配列からなるNox-1に関し、請求の範囲32-38は、Nox遺伝子に関するものである。

しかしながら、請求の範囲32-38のNox遺伝子は、配列番号2のアミノ酸配列からなるNox-1であるとは記載されておらず、調査の結果、Nox遺伝子は、文献「WO 02/081703 A2 (Emory University) 2002.10.17」等に記載されているから、新規でないことが明らかとなった。

結果として、Nox遺伝子は先行技術の域を出ないから、PCT規則13.2の第2文の意味において、上記共通事項は特別な技術的特徴ではない。

それ故、請求の範囲全てに共通の事項はない。

PCT規則13.2の第2文の意味において特別な技術的特徴と考えられる他の意味他の共通の事項は存在しないので、それらの相違する発明の間にPCT規則13の意味における技術的な関連を見いだすことはできない。

よって、請求の範囲1-38は発明の単一性の要件を満たしていないことが明らかである。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS

☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☒ FADED TEXT OR DRAWING

☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.